

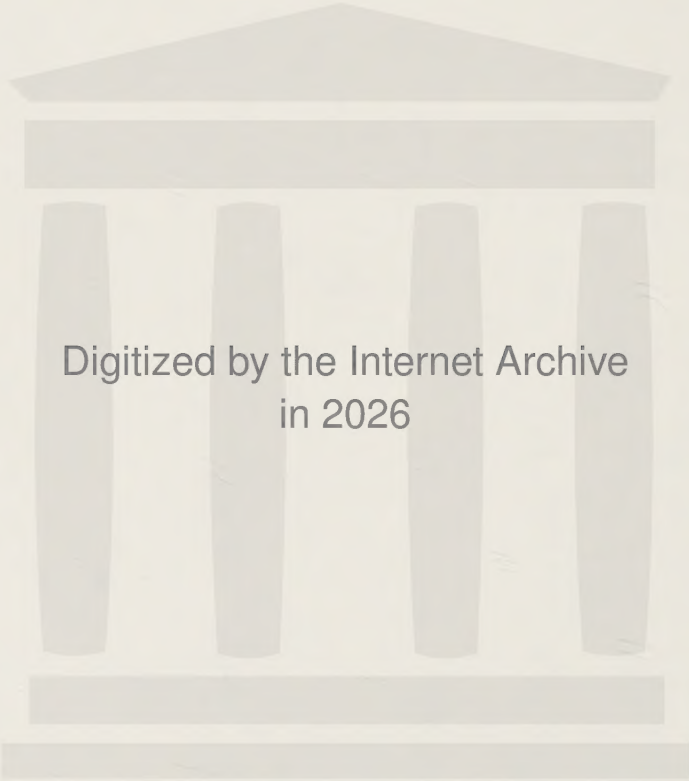
**UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN VERLAUF
EINER INFEKTION PERMANENTER
OSTEOBLASTENZELLEN MIT EINEM
KNOCHENPATHOGENEN LEUKÄMIEVIRUS**

Ingrid Renner-Müller

Disbui. München

1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH
München

Abteilung für Molekulare Zellpathologie

Leiter: PD Dr. Dr. habil. Volker Erfle

vorgelegt über das

Institut für Medizinische Mikrobiologie,

Infektions- und Seuchenmedizin

der Tierärztlichen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c.mult. Anton Mayr

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN VERLAUF EINER INFektion
PERMANENTER OSTEOLASTENZELLEN MIT EINEM
KNOCHENPATHOGENEN LEUKÄMIEVIRUS

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Ingrid Renner-Müller

aus

München

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. M. Rüsse
Referent:	Prof. Dr. Dr.h.c.mult. A. Mayr
Korreferent:	Priv. Doz. Dr. Dr.habil. M. Stangassinger

Tag der Promotion: 26. Februar 1988

Meinen Eltern

INHALTSÜBERSICHT

1.	EINLEITUNG	1
2.	SCHRIFTTUM	2
2.1.	Retroviren	2
2.2.	Murine C-Typ Retroviren	3
2.2.1.	Murine C-Typ Retroviren ohne Onkogen	4
2.2.2.	Murine C-Typ Retroviren mit Onkogen	6
2.3.	Eigenschaften virustransformierter Zellen	7
3.	MATERIAL UND METHODEN	9
3.1.	Zellen	9
3.1.1.	Charakterisierung der Zellen	9
3.1.2.	Zellkultivierung	9
3.1.3.	Untersuchung der Zellen auf Mykoplasmenkontamination	10
3.2.	Viren	11
3.3.	Infektion der permanenten Osteoblastenzellen und immunhistochemischer Nachweis der Infektion	12
3.4.	Darstellung des Zytoskeletts	13
3.5.	Darstellung der extrazellulären Matrix	13
3.6.	Zellwachstumsuntersuchungen	14
3.7.	Untersuchung des absoluten Klonbildungs- wertes	15
3.8.	Histochemische Untersuchung der alkalischen Phosphatase	15
3.9.	Biochemischer Nachweis der alkalischen Phosphatase	15
3.10.	Untersuchung des Zellwachstums im Weichagar-Medium	16
3.11.	"In vivo" Tumorigenität	17
3.12.	Extraktion zellulärer DNS	18
3.13.	Restriktionsenzymverdau der DNS	19
3.14.	DNS-Gelelektrophorese, DNS-Transfer nach Southern	20

3.15.	Isolierung zellulärer RNS	21
3.16.	RNS-Gelelektrophorese, Northern-Blot	21
3.17.	Direkte Übertragung von RNS und DNS auf Filter	22
3.18.	Nukleinsäurehybridisierung	23
4.	ERGEBNISSE	25
4.1.	Virusinfektion von Osteoblastenzellen und Etablierung von OA MuLV-infizierten Osteoblastenzelllinien	25
4.2.	Einfluß der Virusinfektion auf Zellmorphologie, Zytoskelett und extrazelluläre Matrix	26
4.3.	Einfluß der Virusinfektion auf den absoluten Klonbildungswert und auf das Zellwachstum	28
4.4.	Einfluß der Virusinfektion auf die Expression alkalischer Phosphatase	29
4.5.	Einfluß der Virusinfektion auf das Wachstum im Weichagar-Medium	30
4.6.	Tumorigenität OA MuLV-infizierter permanenter Osteoblastenzellen	31
4.7.	Analyse des Virusintegrationsmusters OA MuLV-infizierter permanenter Osteoblastenzellen	32
4.8.	Analyse der Transkription des zellulären myc-Gens	34
5.	BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE	36
6.	ZUSAMMENFASSUNG	44
	SUMMARY	45
	Tabellen	47
	Abbildungen	51
7.	LITERATURVERZEICHNIS	72

Abkürzungen

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
AKV MuLV	endogenes ecotropes MuLV der AKR Maus
ALP	alkalisches Phosphatase
ALV	aviäres Leukosevirus
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat
CH ₁	Zusatzbezeichnung für einen auf hohe alkalische Phosphatase selektierten Osteoblastenzellklon
c-onc	zelluläres Onkogen
cpE	zytopathischer Effekt
cpm	"counts per minute" (Zählimpulse pro Minute)
dCTP	Desoxycytosin-5'-triphosphat
DEPC	Diäthylpyrokarbonat
D'MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
env	für Hüllproteine kodierende Gensequenzen von Retroviren
FBR MSV	Finkel-Biskis-Reilly MSV
FKS	fötales Kälberserum
gag	für gruppenspezifische Strukturproteine kodierende Gensequenzen von Retroviren
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HTLV	Human T-Cell Leukemia Virus
kbp	kilo Basenpaare
LTR	Long Terminal Repeat (lange repetitive Sequenzen), retrovirale Steuergene
LS II	Längenstandard II (Phage Lambda von E. coli mit dem Restriktionsenzym Hind III enzymatisch verdaut)
MC3T3-E1	eine von Kodama et al. aus murinen Calvarien etablierte permanente Osteoblastenzelllinie
MCF	Mink Cell Focus induzierendes murines Retrovirus
mRNS	Boten- (messenger) RNS
MSV	murines Sarkomvirus
MuLV	murines Leukämievirus
OA MuLV	<u>Osteoma</u> induzierendes MuLV
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
p30	Hauptcoreprotein von murinen Leukämieviren
P.E.	Plating Efficiency, absoluter Klonbildungswert
pol	für die reverse Transkriptase (DNS-abhängige Polymerase) kodierende Gensequenzen von Retroviren
pSV	ein unter dem Einfluß des SV (Simian Virus) 40 Promotor stehendes Plasmidinsert

RNS	Ribonukleinsäure
RSV	Rous Sarkomvirus
SAM	Softagar-Medium
SDS	Natrium- (Sodium) Dodecylsulfat- lösung
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat- lösung
TE	Tris-HCl-EDTA-Puffer
TGA	Tris-Azetat-Puffer
TZ	aus Tumoren etablierte Zellen
Upm	Umdrehungen pro Minute
v-onc	in ein virales Genom eingefügtes (transduziertes) zelluläres Onkogen

1. EINLEITUNG

Aus Tumoren von verschiedenen Tierarten und vom Menschen wurden onkogene C-Typ Retroviren isoliert. Bei diesen Virusisolaten handelt es sich einerseits um Viren, die ein sogenanntes Transformationsgen (Onkogen) in ihrem Genom beherbergen und andererseits um Viren, welche nur für ihre Replikation essentielle Gene in ihrem Genom enthalten. C-Typ Retroviren ohne Onkogen sind häufig mit dem Auftreten von Leukämien assoziiert und werden deshalb auch Leukämieviren genannt.

Da die onkogentragenden Retroviren Zellen "in vitro" in wenigen Tagen transformieren können und "in vivo" innerhalb weniger Wochen Tumoren induzieren können, werden sie als schnell transformierende Retroviren bezeichnet. C-Typ Retroviren ohne Onkogen können "in vivo" mit Latenzzeiten zwischen mehreren Monaten und Jahren Leukämien, solide Tumoren und andere pathologische Veränderungen verursachen. Deshalb werden diese Viren als langsam transformierende Retroviren bezeichnet.

Für C-Typ Retroviren ohne Onkogen wurde bisher keine "in vivo" Induktion von Tumoren des Stützgewebes (Sarkome) bzw. keine Transformation von Fibroblasten "in vitro" beschrieben. 1984 wurde von Schmidt et al. ein murines C-Typ Retrovirus isoliert, das sowohl Lymphome als auch Osteome und Osteopetrose induziert. Es war das Ziel der vorliegende Arbeit den Einfluß dieses knochenpathogenen Retrovirus (OA MuLV) auf differenzierungsfähige Osteoblastenzellen zu untersuchen. Insbesondere sollte die Frage geklärt werden, ob Osteoblastenzellen durch das Virus "in vitro" maligne transformiert werden können. Darüber hinaus sollten verschiedene mögliche Einflüsse der Virusinfektion auf das Wachstums- und Differenzierungsverhalten der Zellen untersucht werden.



2. SCHRIFTTUM

2.1. Retroviren

Die Familie der Retroviridae läßt sich in die Subfamilien Onkovirinae, Spumavirinae und Lentivirinae einteilen. Für die Tiermedizin bedeutsame Vertreter der Subfamilie der Onkovirinae rufen Leukosen bei Vögeln und einigen Säugetieren hervor. Wichtige Beispiele hierfür sind das feline und das bovine Leukämievirus. Außerdem werden weitere Vertreter dieser Subfamilie auch für verschiedene solide Tumoren, wie Lymphome und Karzinome, verantwortlich gemacht.

Die Bedeutung der Retroviren aus der Subfamilie der Spumavirinae als Krankheitserreger ist bisher unbekannt. Zur Subfamilie der Lentivirinae wird der Erreger der Visna-Maedi-Erkrankung des Schafes, das Virus der infektiösen Anämie des Pferdes und das momentan für die Humanmedizin wichtigste Retrovirus, das HIV (Human Immunodeficiency Virus), der Erreger des AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome) zugeordnet.

Alle Retroviren enthalten als genetische Information eine einsträngige RNS und besitzen eine lipidhaltige Hülle. Die Viren dieser Familie enthalten ein typisches Enzym, die reverse Transkriptase, eine RNS-abhängige DNS-Polymerase (Baltimore, 1970).

Die Subfamilie der Onkovirinae läßt sich nach morphologischen Gesichtspunkten in B-Typ, C-Typ und D-Typ Onkoviren einteilen. B- und D-Typ Retroviren besitzen einen in der Hülle exzentrisch gelegenen Innenkörper (Core). Das Core der C-Typ Retroviren ist dagegen konzentrisch angeordnet (Bernhard, 1958).

2.2. Murine C-Typ Retroviren

Die wichtigsten Vertreter der murinen Retroviren sind die C-Typ Retroviren und ein B-Typ Retrovirus, das murine Mammakarzinomvirus. Murine C-Typ Retroviren werden in endogene und exogene Retroviren unterschieden, wobei letztere weiterhin in langsam transformierende Leukämieviren (MuLV) und in schnell transformierende, onkogen-tragende, aber nicht replikationskompetente Sarkomviren (MSV) unterteilt werden. Endogene Retroviren bzw. retrovirusverwandte Sequenzen kommen bei den meisten Säugertieren, einschließlich des Menschen, als stabil integrierte Gensequenzen im jeweiligen Wirtsgenom vor und werden entsprechend den Mendelschen Regeln vererbt (Aaronson und Stephenson, 1979). Sie bleiben entweder latent oder können durch verschiedene physikalische und chemische Agentien, wie ionisierende Strahlen (Erflé et al., 1981) und karzinogene Chemikalien (Tennant et al., 1982), oder auch spontan (Hartley et al., 1977; Schmidt et al., 1984) aktiviert und als infektiöse Viruspartikel exprimiert werden. Endogene Retroviren werden teilweise auch während der prä- und postnatalen Entwicklung exprimiert (Sleight, 1985).

Die murinen C-Typ Retroviren unterscheiden sich in ihrer Zellspezifität bezüglich Infektiosität und Vermehrung. Sie sind entweder ecotrop, d.h. sie vermehren sich nur im homologen Wirt, also in Zellen der Maus, oder xenotrop, d.h. sie vermehren sich nur in Zellen anderer Spezies. Außerdem wurden auch amphotrope und polytrope Viren gefunden, die sich in den Zellen des homologen Wirtes als auch in Zellen anderer Spezies vermehren können. Die polytropen Vertreter stellen genetische Rekombinanten aus ecotropen und xenotropen Viren dar. Viele der polytropen Viren induzieren zytopathische Effekte in Nerzlungenzellen und werden deshalb auch MCF- (Mink Cell Focus-inducing) Viren genannt (Levy, 1978; Rowe et al., 1979).

2.2.1. Murine C-Typ Retroviren ohne Onkogen

Das Genom vermehrungsfähiger muriner C-Typ Retroviren besteht aus drei aufeinander folgende Gensequenzen (gag, pol, env), die für gruppenspezifische Strukturproteine (gag), die DNS-Polymerase (pol) und die Hüllproteine (env) des Virus kodieren. Am 5'- und 3'-Ende des Virusgenoms sind jeweils sogenannte LTRs (Long Terminal Repeats), also repetitive Sequenzen lokalisiert, die sowohl die Transkription des Virusgenoms regulieren als auch Einfluß auf die Expression benachbarter zellulärer Gene nehmen können (Risser et al., 1983; King et al., 1985).

In der Maus kann die Infektion durch C-Typ Retroviren ohne Onkogen verschiedene pathologische Veränderungen zur Folge haben (Greenberger et al., 1975; Frederickson et al., 1984; Ulrich et al., 1985; Gardner et al., 1976).

Die murinen Leukämieviren induzieren bei Mäusen in der Regel Leukämien und Lymphome. Die Erkrankungen unterscheiden sich durch verschiedene klinische Bilder sowie durch unterschiedliche Genetik und Immunologie (Zijlstra et al., 1986).

Bekannte Beispiele für exogene murine Leukämieviren sind das Gross-Leukämievirus (Gross, 1951), das Friend-Leukämievirus (Friend, 1957), das Moloney-Leukämievirus (Moloney, 1960) sowie das Rauscher-Leukämievirus (Rauscher, 1962).

Auch die Aktivierung endogener Viren kann zur Produktion infektiöser Viruspartikel führen, welche anschließend für unterschiedliche pathologische Veränderungen verantwortlich sind. Die infektiösen endogenen C-Typ Viren können maligne Tumoren des hämatopoetischen Systems, Knochenläsionen, wie Osteome und Osteopetrosen (Schmidt et al., 1984; Erfle et al., 1986), und Veränderungen im Gehirn, die zu neurologischen Symptomen führen (Fredrickson et al., 1984), induzieren.

Die Expression von endogenen ecotropen C-Typ Retroviren wird zum Beispiel bei der AKR Maus (AKV MuLV) mit der Entstehung spontan auftretender Leukämien in Verbindung gebracht (Nowinski und Hayes, 1978). Dieses Phänomen läuft unter Rekombination mit endogenen xenotropen C-Typ Retroviren ab, die in hoher Kopienzahl im Mäusegenom vorkommen (Hartley et al., 1977; Eider et al., 1977).

In der dritten Gruppe der endogenen C-Typ Retroviren der Maus, den amphotropen Retroviren, gibt es einen Virustyp, der in Wildmäusen in Südkalifornien gefunden wurde und Leukämien und neurologische Symptome hervorrufen kann (Gardner et al., 1978).

Murine C-Typ Retroviren ohne Onkogen können also, wenn auch mit langen Latenzzeiten, Leukämien, solide Tumoren und neurologische Symptome hervorrufen. Möglicherweise wird eine Zelltransformation durch die Insertion des viralen Promotors (in der LTR) in der Nachbarschaft eines zellulären Gens initiiert.

So wird das zelluläre myc-Gen in den meisten Hühner-B-Lymphomen, die durch das aviäre Leukosevirus (ALV) hervorgerufen werden, aktiviert. Dieses zelluläre Gen ist zum Transformationsgen eines akuten aviären Leukämievirus (MC 29) homolog (Hayward et al., 1981).

Ebenso zeigen 25 % der durch Leukämieviren induzierten murinen T-Lymphome eine Aktivierung des zellulären myc-Gens (Corcoran et al., 1984). Neben der Aktivierung dieses Gens werden auch andere Gene gefunden, die durch retrovirale Insertion aktiviert werden können. Hierzu gehören zwei weitere Protoonkogene: das c-erb B, welches durch die Insertion des aviären Leukosevirus aktiviert werden kann (Goodwin et al., 1986), und das c-myb, das durch die Insertion des murinen Moloney Leukämievirus zu einer vermehrten Transkription angeregt werden kann (Shen-Ong et al., 1986).

Eine andere mögliche Erklärung für die langsam transformierenden Eigenschaften von C-Typ Retroviren ohne Onkogen ist die Kodierung des Virus für ein trans-aktivierendes Protein. Dieses Protein könnte nach der Anlagerung an

entfernte Gensequenzen nicht nur eine Virustranskription verstärken, wie dies vom Rinderleukämievirus (Rosen et al., 1986), vom HTLV (Human T-Cell Leukemia Virus) I (Sodroski et al., 1984) und HTLV II (Rosen et al., 1986) und von onkogenen DNS-Viren (Gendelman et al., 1986) beschrieben worden ist, sondern auch zelluläre Gene beeinflussen.

2.2.2. Murine C-Typ Retroviren mit Onkogen

Murine Sarkomviren (MSV) enthalten in ihrem Genom Sequenzen (v-onc), die mit Gensequenzen (c-onc) normaler Wirtszell-DNS weitgehend übereinstimmen. Durch Einfügung (Transduktion) dieser zellulären Sequenzen in ein MuLV-Genom und anschließender Mutation erreicht das Virus eine hohe tumorigene Potenz. Die Integration dieser Gensequenzen in das Virusgenom führt allerdings zum teilweisen Verlust von Virusgenen, die für die Replikation nötig sind. Deshalb benötigen Sarkomviren für ihre Vermehrung ein sogenanntes replikationskompetentes Helfervirus. Als solches fungiert in der Regel ein Leukämievirus.

Murine Sarkomviren transformieren mesenchymale Zellen "in vitro" (Bassin et al., 1968) und induzieren innerhalb weniger Wochen Sarkome (Price et al., 1972). Ebenso kommt es nach der Injektion von Zellen, welche mit murinen Sarkomviren transformiert worden sind zur raschen Entwicklung von Tumoren in Mäusen.

2.3. Eigenschaften virustransformierter Zellen

Morphologisch unterscheiden sich virustransformierte Zellen von nicht transformierten Zellen durch den pleomorphen Charakter der Einzelzellen und durch den Verlust der "Kontaktinhibition", der zu unregelmäßiger Zellverteilung und zum sogenannten "criss-cross" Wachstum der Zellen in der Kultur führt. Dieses veränderte Wachstum entwickelt sich meist einige Tage nach Einsaat der Zellen und führt zu fokalen Läsionen (Foci) in der Zellkultur (Hartley und Rowe, 1966). Das Zytoskelett, das unter anderem die Zellmorphologie bestimmt, ist bei nicht transformierten Zellen über die Zellmembran mit den Zellmatrixproteinen verbunden (Tamkun et al., 1986). Transformierte Zellen zeigen nicht nur Depolymerisation der Mikrofilamente des Zellskeletts (Pollack et al., 1975), sondern häufig auch eine reduzierte Produktion von Matrixproteinen (Vaheri et al., 1978) bzw eine reduzierte Ablagerung von Fibronektin, einem der Hauptmatrixproteine, auf der Zellmembran (Schmidt et al., Manuskript eingereicht). Fibronektin vermittelt die Verbindung der Zellen untereinander sowie Anheftung an die Substratunterlage (Yamada et al., 1978a, 1978b).

Die Transformation beeinflusst neben der Zellmorphologie und der Expression von Zellmatrixproteinen auch den Differenzierungsgrad einer Zelle. Differenzierende Zellkulturen können durch die Transformation mit Sarkomviren ihre differenzierungsspezifischen Merkmale verlieren. In Hühnerchondroblasten, welche "in vitro" differenzieren können, wird die Proteoglykansulfat-Expression (Pacifici et al., 1977) und die Kollagen Typ II-Synthese (Yoshimura et al., 1981) durch die Transformation mit dem Rous Sarkomvirus (RSV) vermindert. In Osteoblastenzellen wird nach der Transformation mit dem FBR Osteosarkomvirus (Finkel et al., 1966) eine stark verminderte Expression alkalischer Phosphatase festgestellt (Schmidt et al., 1987).

Als Folge der Virustransformation kommt es also zum Verlust des funktionellen Gleichgewichtes zwischen Zellproliferation und Zelldifferenzierung und somit zur erhöhten Zellproliferation (Sparks et al., 1986).

Eines der wichtigsten Merkmale virustransformierte Zellen ist ihre Fähigkeit sich "in vitro" nahezu unbegrenzt teilen zu können (Immortalisierung). Diese Fähigkeit ist allen transformierten Zellen gemeinsam (Knippers et al., 1986).

Eine weitere Eigenschaft, die virustransformierte Zellen erlangen können, ist die Fähigkeit zum Wachstum in halbfestem Agar-Medium (MacPherson et al., 1964). Diese Fähigkeit gilt als Hinweis auf eine tumorigene Potenz. Der Nachweis der Tumorigenität erfolgt durch die Induktion von Tumoren in syngeneten oder immunsupprimierten Tieren bzw. in nu/nu Mäusen bei menschlichen Zellen (Kakunaga, 1978).

Außer diesen Merkmalen virustransformierter Zellen gibt es noch viele weitere Eigenschaften, die Zellen nach einer Transformation erlangen können. Dazu gehören unter anderem die Fähigkeit zum Wachstum bei reduzierter Serumkonzentration, die erniedrigte cAMP-Konzentration und das herabgesetzte Transportvermögen für Aminosäuren, Kohlenhydrate und Nukleoside (Literatur siehe Clarkson und Baserga, 1974).

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Zellen

3.1.1. Charakterisierung der Zellen

Für die Untersuchungen wurde die permanente MC3T3-EI-Osteoblastenzelllinie, eine aus Calvarienzellen einer C57BL/6 Maus etablierte Zelllinie (Kodama et al., 1981), verwendet.

Diese Zelllinie zeigt einige für Osteoblasten typische Merkmale. Hierzu gehören unter anderem die hohe Kollagen Typ I-Synthese (Osaki et al., 1984) und die "in vitro" Mineralisierung (Ikeda et al., 1986). Das für die Etablierung angewandte 3T3-Schema (Todara und Green, 1963) führte zu einer Zelllinie, die nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens "in vitro" differenziert und für Osteoblasten typische Markermoleküle, wie die alkalische Phosphatase, vermehrt exprimiert (Sudo et al., 1983). Die ursprünglich verwendete MC3T3-EI-Zelllinie zeigte allerdings nur eine geringe Fähigkeit zur spontanen Differenzierung. Erst ein durch Subklonierung und Selektion auf hohe alkalische Phosphatase Aktivität (ALP) (Schmidt et al., 1987) gewonnener Klon (CH_1) zeigte wieder die von Kodama et al. (1981) und Sudo et al. (1983) beschriebenen Differenzierungsfähigkeit "in vitro".

3.1.2. Zellkultivierung

Die Kultivierung der Zellkulturen erfolgte bei 37°C mit 5 %iger CO_2 -Spannung und gesättigter Wasserdampf-atmosphäre. Als Anzucht- und Erhaltungsmedium wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (D'MEM) der Firma Gibco mit 2,2 g/l Bicarbonat unter Zusatz von 10 % hitzeinaktiviertem fötalem Kälber-Serum (FKS) (Fa. Flow) verwendet.

Zum Passagieren der Zellen (zweimal wöchentlich) wurde das Medium aus den Kulturflaschen abgegossen, zweimal mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS, siehe Anhang 1) gewaschen und eine Trypsinlösung (siehe Anhang 2) zugegeben. Nach dem Ablösen der Zellen wurde die Zellzahl mit Hilfe eines elektronischen Zellzählers (Coulter Counter Modell ZM) bestimmt. Die Zellzahl für die Neueinsaat betrug in der Regel 4×10^3 Zellen/ cm^2 Wachstumsfläche.

3.1.3. Untersuchung der Zellen auf Mykoplasmenkontamination

Die Zellkulturen wurden alle 4 - 6 Wochen auf Mykoplasmenkontamination untersucht.

Der Mykoplasmennachweis erfolgte mit der DNS-Markierungsmethode nach Chen (1977). 2×10^5 Zellen wurden mit 3 ml Medium in Petrischälchen eingesät und 1 - 2 Tage danach untersucht. Das Medium wurde abgekippt, die Zellen mit PBS gewaschen, 10 Minuten mit Methanol-Eisessig (3:1) fixiert und luftgetrocknet. Anschließend wurde das Präparat 10 Minuten mit Bisbenzimid H 33258 (Fa. Hoechst) in McIlvaine Puffer (0,5 $\mu\text{g}/\text{l}$, pH 5,5; siehe Anhang 3) inkubiert. Nach dem Waschen mit Wasser erfolgte die Auswertung im Fluoreszenzmikroskop (Fa. Leitz).

3.2. Viren

Für die Untersuchung des Einflusses auf Osteoblastenzellen wurde ein murines Osteomvirus (OA MuLV) und ein murines Osteosarkomvirus (FBR MSV) verwendet.

Das OA MuLV ist ein ecotropes C-Typ Retrovirus aus spontanen Osteomen der 101 Maus. Dieses Virus, das keine zu einem bekannten zellulären Onkogen homologe Sequenzen enthält, induziert nach einer Latenzzeit von 12 - 16 Monaten Osteome (Inzidenz 18 - 27 %), Osteopetrose (Inzidenz 60 - 73 %) und Lymphome (Inzidenz 60 - 86 %), d.h. es beeinflusst neben Zellen des lymphatischen Systems auch Skelettzellen (Schmidt et al., 1984, 1987). Eine Charakterisierung des OA MuLV-Genoms und die Erstellung einer Restriktionenzymkarte dieses Leukämievirus wurde von Leib-Mösch et al. (1986) vorgenommen.

Die Restriktionenzymkarte von OA MuLV zeigt, wie bei den meisten endogenen murinen Retroviren (Chattopadhyay et al., 1980), jeweils eine Pst I-Schnittstelle in den an beiden Seiten des Virusgenoms liegenden repetitiven Sequenzen. Die Länge dieses Pst I - Pst I-Fragments liegt zwischen 8 und 9 kbp. Das Restriktionsenzym Sac I hat im OA MuLV-Genom eine Schnittstelle im pol-Gen und Schnittstellen im zellulären Genom, das Restriktionsenzym Eco RI schneidet nur in der jeweils benachbarten zellulären DNS.

Das FBR MSV ist ein aus einem strahleninduzierten Osteosarkom einer XG/f Maus stammendes Osteosarkomvirus (Finkel et al., 1973; Finkel, 1975). Durch die Integration des fos-Onkogens, einer transformierenden Basensequenz, und einer weiteren zellulären Sequenz, der fox-Sequenz (Van Beveren et al., 1984), kam es in diesem Virus zur Verkürzung des gag- und des env-Gens und zur Deletion des pol-Gens (Verma, 1986). Durch den teilweisen Verlust dieser für die Replikationsfähigkeit nötigen Virusgene, benötigt das FBR MSV ein replikationsfähiges Helfervirus.

3.3. Infektion der permanenten Osteoblastenzellen und immunhistochemischer Nachweis der Infektion

Die Osteoblastenzellen wurden 6 mal innerhalb von 3 Tagen (erstmal 3 Stunden nach Einsaat) mit zellfrei filtriertem ($0,2 \mu\text{m}$ Milliporefilter) Zellkulturüberstand einer OA MuLV-produzierenden Zellkultur unter Zugabe von $4 \mu\text{g/ml}$ Polybrene infiziert. Diese Virussuspension (Infektionstiter ca. 10 infektiöse Partikel/ MC3T3-CH₁-Zelle) wurde jeweils eine Stunde nach Zugabe wieder abgesaugt, die Zellkultur mit PBS gewaschen und mit D'MEM mit 10 % FKS weitergezüchtet.

Der Nachweis der Infektion der Zellen erfolgte durch die indirekte Immunperoxidase Färbung, mittels welcher das Hauptcoreprotein p30 von murinen Leukämieviren markiert wird (Nexø, 1977).

Hierfür wurden die Zellen im subkonfluenten Zustand mit PBS gewaschen, mit Methanol-Azeton (-20°C , 1:1) fünf Minuten fixiert, luftgetrocknet und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit bovinem Serumalbumin (2 % in PBS, 10 Min.) inkubiert.

Der 1. Antikörper, ein Kaninchenantikörper gegen virales Protein p30 (Schmidt et al., 1985), wurde mit einer BSA-Lösung (1 % in PBS) 1:500 verdünnt und auf die Zellen gegeben (1 Std., 37°C).

Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem 1:1000 verdünnten 2. Antikörper, einem Peroxidasegekoppelten Ziegenantikörper gegen Kaninchen IgG (1 Std., 37°C).

Anschließend wurde wieder mit PBS gründlich gewaschen und durch Zugabe des filtrierten Substrats (siehe Anhang 4; 20 Min., 20°C) die markierten Zellen sichtbar gemacht. Das Ergebnis wurde im Lichtmikroskop (Firma Leitz) ausgewertet und bei 250-facher Vergrößerung fotografiert (Schwarz/Weiß-Film DIN 18).

3.4. Darstellung des Zytoskeletts

Das Zytoskelett (Aktin) der Zellen wurde mit der Phalloidin-Markierungsmethode untersucht. Rhodamin-markiertes Phalloidin wurde freundlicherweise von Prof. T. Wieland, MPI Heidelberg, zur Verfügung gestellt. Petrischälchen mit MC3T3-CH₁-Zellen wurden im subkonfluenten Zustand mit PBS gewaschen, mit Paraformaldehyd (3,5 % in PBS) fixiert (20 Min., 4°C) und die Zellmembran mit Triton X-100 (0,2 % in PBS) permeabilisiert (10 Min., 20°C). Im Anschluß an eine zweimaliger Spülung mit PBS erfolgte die Markierung durch Inkubation der Zellen mit einer Phalloidinlösung (0,001 % in PBS, 30 min., im Dunklen). Nach gründlichem Waschen mit PBS wurde die Färbung im Fluoreszenzmikroskop (Fa. Leitz, 546 nm Erregerfilter, 590 nm Sperrfilter) ausgewertet. Fotografiert wurde unter Verwendung eines Schwarz/Weiß-Filmes (DIN 27) bei 625-facher Vergrößerung.

3.5. Darstellung der extrazellulären Matrix

Der Nachweis des Hauptmatrixproteins (Fibronectin) der MC3T3-CH₁-Zellen erfolgte immunhistochemisch. Das Antiserum (1. Antikörper) gegen Fibronectin (Human-plasma-Fibronectin, Fa. Sigma, St. Louis, USA) wurde im Kaninchen in der GSF hergestellt. Als 2. Antikörper diente FITC-gekoppelter Ziegenantikörper gegen Kaninchen IgG (Fa. Boehringer). Subkonfluente Zellen wurden wie unter 3.4. beschrieben vorbehandelt. Anschließend wurde der 1. Antikörper 1:25 mit einer BSA-Lösung (1 % in PBS) verdünnt und die Zellen 60 Minuten bei 37°C unter Verwendung eines Deckglases inkubiert. Die Inkubation von Zellen mit einem 1:25 verdünntem Kaninchenserum diente als Kontrolle.

Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem 1:10 verdünntem 2. Antikörper (Ziegen anti Kaninchen IgG-FITC) ebenfalls 60 Minuten bei 37°C unter einem Deckglas. Die Färbung wurde wieder im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet und fotografiert.

3.6. Zellwachstumsuntersuchungen

Jeweils 10^4 infizierte- bzw. Kontroll-Zellen wurden in 2x2-Mikrotiterplatten (Wachstumsfläche 2 cm^2) im Vierfachansatz eingesät, im Brutschrank inkubiert und das Wachstum nach 1, 3, 5 und 7 Tagen bestimmt. Die Mittelwerte der gezählten Zellzahlen wurden als Wachstumskurven graphisch dargestellt. Die Berechnung der Wachstumskonstanten während des logarithmischen Wachstums (1.-3. Tag nach Zelleinsaat) erfolgte nach folgender Formel:

$$N = N_0 \times e^{k \times t}$$

N = Zellzahl am Beobachtungsende (3. Tag nach Einsaat)

N_0 = Zellzahl am Beobachtungsanfang (1. Tag nach Einsaat)

t = Zeitdifferenz (48 Stunden)

k = Wachstumskonstante

Die Zellverdoppelungszeit wurde durch das Auflösen der Formel nach t_2 errechnet:

$$t_2 = \frac{\ln 2}{k}$$

3.7. Untersuchung des absoluten Klonbildungswertes (Plating Efficiency, P.E.)

Jeweils 500 Zellen wurden in 10 ml Medium im Doppelansatz in Petrischalen eingesät und 12 Tage bei 37°C inkubiert. Zur Auswertung wurde das Medium abgekippt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und 10 Minuten mit 70 %igem Alkohol fixiert. Nach der Trocknung und Färbung mit einer 1:10 verdünnten Giemsalösung (Fa. Merck) erfolgte das Zählen der Zellkolonien und die Berechnung der Plating Efficiency nach folgender Formel:

$$a/b \times 100 \% = \text{P.E.}$$

a = Anzahl der Kolonien pro Petrischale

b = eingezählte Zellen

3.8. Histochemische Untersuchung der alkalischen Phosphatase (ALP)

Jeweils 1×10^5 Zellen pro Petrischälchen wurden 5 bzw. 10 Tage bei 37°C inkubiert, einmal mit PBS gewaschen, 10 Minuten mit 4°C kalter Formalin-Kalzium-Lösung (nach Baker) fixiert und mit der Substratlösung für ALP (siehe Anhang 5) inkubiert. Nach der 60-minütigen Einwirkzeit bei 20°C wurde mit Wasser gespült und im Lichtmikroskop ausgewertet.

3.9. Biochemischer Nachweis der alkalischen Phosphatase

Der quantitative Nachweis der alkalischen Phosphatase erfolgte nach der Methode von Mössner et al. (1980), modifiziert nach Schmidt et al. (1987).

Dazu wurden im Vierfachansatz 10^4 Zellen pro Vertiefung in 2x2-Mikrotiterplatten eingesät und 10 Tage bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit einem Zellschaber vom Untergrund gelöst,

in 250 μ l Nonidetlösung (0,2 % in Aqua dest., 0,2 mM MgCl_2) gesammelt und bei -20°C gelagert.

Nach dem Auftauen wurden die Zellsuspensionen 10 Minuten bei 600 g zentrifugiert (Heraeus Christ Labofuge) und die Überstände für die biochemischen Nachweise verwendet.

Für den ALP-Test wurden jeweils 20 μ l Zellysat mit 180 μ l Substratlösung (1 M Diäthanolamin, pH 9,8; 0,5 mM MgCl_2 , 15 mM Paranitrophenylphosphat) in Mikrotiterplatten gemischt und die Extinktion bei 404,7 nm photometrisch gemessen (SLT 210.2 Spectrophotometer).

Die Berechnung der Aktivität erfolgte nach der Erstellung einer Eichkurve aus Werten von definierten Verdünnungen einer alkalischen Phosphatase-Enzymlösung.

Die Proteinstimmung wurde unter Verwendung von Bicinchoninsäure (Smith et al., 1985; Redinbaugh und Turley, 1986) ebenfalls in Mikrotiterplatten durchgeführt.

Hierfür wurden jeweils 20 μ l Zellysat mit 180 μ l Reagenz A:B (siehe Anhang 6) im Verhältnis 50:1 versetzt und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Die photometrische Messung wurde bei 577 nm durchgeführt, die Berechnung erfolgte nach Erstellen einer Eichkurve aus Werten von verdünnten BSA-Lösungen. Die spezifische Aktivität der alkalischen Phosphatase wurde in Einheiten ALP-Aktivität pro Proteinmenge (E/ mg Protein) ausgedrückt.

3.10. Untersuchung des Zellwachstums im Weichagar-Medium

Die Untersuchung des Wachstums der Zellen im Weichagar-Medium (Softagar, siehe Anhang 7 und 8) erfolgte nach der Methode von Lloyd et al. (1979).

Zellsuspensionen von jeweils 10^3 und 10^4 Einzelzellen/ ml Medium wurden mit jeweils 2 ml Softagarmedium (SAM, 44°C) gemischt und auf eine halbfeste Agarunterlage pipettiert. Zur Versorgung mit Nährstoffen wurde alle 2 - 4 Tage 1 ml Medium in die Kulturschalen pipettiert. Nach 21 Tagen Inkubationszeit erfolgte das Zählen der ausgewachsenen Zellklone .

3.11. "In vivo" Tumorigenität

Für die Untersuchung der Tumorigenität der Zellkulturen wurden weibliche C57BL/6 Mäuse aus der Tierzucht und Tierhaltung der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung verwendet.

Die Züchtung der Mäuse erfolgte unter spezifisch pathogenfreien (SPF) Bedingungen (Erflé und Neumann, 1980). Die Tiere bekamen Altromin Standard Diät und Wasser ad libitum. Die Untersuchungen wurden an jeweils 6 bis 10 neugeborenen Mäusen durchgeführt.

Zur Gewinnung der Zellen für die Injektion wurden konfluente Zellkulturen in Rouxflaschen zweimal mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von PBS wurden die Zellen mit Gummizellschabern von den Kulturgefäßen abgeschabt und die Zellsuspension zur Volumeneinengung 10 Minuten bei 100 g (Heraeus Christ Labofuge) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in PBS suspendiert und in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen in 50 μ l PBS pro Maus mit einer Tuberkulinspritze in die Nackengegend subkutan injiziert. Eine Untersuchung der Tiere erfolgte täglich, außer sonntags. Mäuse mit sichtbaren Tumoren wurden getötet und sezziert. Die Tumoren wurden entnommen, in Formalin fixiert und die Tumordiagnose histologisch erstellt. Teilweise erfolgte eine sterile Entnahme von Tumorstücken zur Etablierung von Zellkulturen oder zur Isolierung der DNS. Unauffällige Tiere wurden am Ende der Versuche, nach 3 Monaten, wie tumortragende Tiere untersucht.

3.12. Extraktion zellulärer DNS

Die zelluläre DNS wurde (in Anlehnung an Maniatis, 1982) aus jeweils mindestens 0,5 g Tumorgewebe, bzw. 5×10^7 Zellkulturzellen gewonnen. Letztere wurden wie unter 3.11. beschrieben geerntet. Das Abschaben der Zellen konnte jedoch durch Abtrypsinieren ersetzt werden. Die Lagerung der Zellpellets erfolgte bei -70°C .

Zum Zellaufschluß wurde das gefrorene Pellet mittels eines Dismembrators (Fa. Braun) pulverisiert. Dies erfolgte in einer Teflonkapsel mit Stahlkugel unter Zugabe von etwa 2 ml flüssigem Stickstoff. Anschließend wurde das Zellpulver mit einer Homogenisierungslösung (siehe Anhang 9) zu einem homogenen Brei verrührt und in ein Polypropylen-Zentrifugenröhrchen mit 10 - 15 ml Homogenisierungslösung verbracht. Zum Abbau der Proteine durch die Proteinase K wurde das Gemisch zuerst im Wasserbad (1 - 2 Stunden, 50°C) und anschließend im Brutschrank (über Nacht, 37°C) inkubiert.

Die Isolierung und Reinigung der DNS begann mit einer dreimaligen Phenolisierung des Zellhomogenats mit gleichen Teilen Phenol (Tris-gesättigt) und Chloroform (Chloroform: Isoamylalkohol, 24:1) und einer dreimaligen Chloroformextraktion.

Hierbei wurde das Homogenat mit dem jeweils gleichen Volumen der oben genannten Chemikalien gründlich gemischt (Testtube rotator, 10 Min., 20 Upm) und jeweils zehn Minuten bei 16500g (RC-5C-Zentrifuge, Fa. Sorvall) zentrifugiert. Anschließend konnte die DNS-enthaltende wässrige Phase von der unteren organischen Phase vorsichtig abpipettiert werden.

Nach der letzten Extraktion erfolgte zur Volumeneinengung eine Äthanolfällung der DNS. Hierbei wurde 1/20 des Volumens 3 M Natrium-Azetat, pH 5,2, und das 2,5-fache Volumen Äthanol (reinst, -20°C) zugegeben. Das Präzipitat wurde mittels eines Glasstabes entnommen, in 70 %igem Alkohol gewaschen und in 1 - 2 ml TE (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA) aufgenommen.

Das Lösen der DNS erfolgte im Wasserbad (1 - 2 Stunden, 50°C) und anschließend im Brutschrank (über Nacht, 37°C). Die DNS-Lösung wurde mit Pankreas-RNase (Fa. Sigma)

(100 µg/ml, 60 Min., 37°C) und mit Proteinase K (Fa. Merck) (100 µg/ml, 30 Min., 37°C) inkubiert.

Zur Reinigung von Proteinresten wurde anschließend wieder zweimal phenolisiert und zweimal mit Chloroform extrahiert. Das folgende einmalige vorsichtige Ausschütteln mit einer gleichen Menge Diäthyläther diente zur Entfernung von Phenol- und Chloroformresten. Nach dem Verwerfen der oberen Ätherphase wurde wieder eine Äthanol-fällung durchgeführt.

Die DNS-Lösung wurde in Ultrahülsen (Fa. Schleicher und Schuell, UH 100/25) gegen TE (1 l Puffer auf 1 ml DNS-Lösung, 4°C) über Nacht dialysiert. Durch die anschließende Druckdialyse mittels Wasserstrahlpumpe wurde die Probe auf ein Volumen von 0,5 - 1 ml eingeengt.

Die Ermittlung der Konzentration der DNS-Lösung erfolgte durch Messung der optische Dichte (1 OD = 50 µg DNS/ml) bei 260 nm (Photometer, Fa. Gilford). Als Kontrolle der errechneten Konzentration wurde die DNS-Suspension auch auf eine Ethidiumbromidplatte (1 % Agarose, 0,5 µg/ml Ethidiumbromid) aufgetüpfelt und die unter UV-Licht aufleuchtende Fluoreszenz mit Standard-DNS-Lösungen aus Lachssperma-DNS verglichen.

Die Lagerung der Proben erfolgte bei 4°C.

3.13. Restriktionsenzymverdau der DNS

Die DNS wurde mit den Restriktionsenzymen Eco RI und Sac I (Fa. Boehringer, 5 Einheiten/µg DNS) enzymatisch verdaut. Als Reaktionspuffer diente Y-100 beim Eco RI-Verdau und Y-0 beim Sac I-Verdau (siehe Anhang 10). Die Inkubation mit den jeweiligen Enzymen erfolgte über Nacht bei 37°C.

Im Anschluß wurde die Reaktion bei 65°C (Wasserbad, 5 Min.) gestoppt und die DNS-Lösung im Eisbad abgekühlt.

Für die gelelektrophoretisch Auftrennung wurden die Proben mit jeweils 5 μ l Auftragspuffer (0,1 % Bromphenolblau, 80 % Glyzerin) versetzt.

3.14. DNS-Gelelektrophorese, DNS-Transfer nach Southern

Zur Auftrennung der DNS-Fragmente wurden 400 ml-Gele (20x25 cm) aus Tris-Azetat-Puffer (TGA, siehe Anhang 11), 0,8 % Agarose und 0,5 μ g/ml des UV-induzierbaren Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid verwendet. Als Laufpuffer wurde TGA verwendet und als Längenstandard kam radioaktiv-markierter- und unmarkierter Längenstandard II (Phage Lamda von E. coli mit dem Restriktionsenzym Hind III enzymatisch verdaut) zur Anwendung.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel im durchscheinenden UV-Licht mit einer Polaroid-Sofortbildkamera unter Verwendung eines Rotfilters photographiert. Die weitere Bearbeitung der DNS erfolgte nach einer modifizierten Methode nach Southern (1975). Hierbei wurde das Gel zur Hydrolyse der DNS 15 Minuten in einer 0,25 M HCl-Lösung inkubiert, 45 Minuten mit einer Denaturierungslösung (0,2 M NaOH, 0,6 M NaCl) behandelt und anschließend in 1 M Tris-HCl, 0,6 M NaCl, pH 7,5, neutralisiert. Die Übertragung der DNS aus dem Gel auf Nitrozellulosefilter (Schleicher und Schuell, 20 x 20 cm) (Blotten) wurde unter Verwendung von 20x SSC (1x SSC = 0,15 M NaCl, 0,015 M Natrium-Citrat) und 3MM Chromatographie-Papier (Fa. Whatman) über Nacht durchgeführt.

Das Nitrozellulosefilter wurde bei Raumtemperatur getrocknet, zur Immobilisierung der DNS zwei Stunden bei 80°C "gebacken" und anschließend, für die spätere Hybridisierung, in eine Plastiktüte eingeschweißt. Zur Kontrolle des erfolgreichen DNS-Transfers wurde das verbleibende Gel mit Ethidiumbromid (0,2 μ g/ml Aqua dest.) angefärbt und unter UV-Licht untersucht.

3.15. Isolierung zellulärer RNS

Die Isolierung der zellulären RNS erfolgte in Anlehnung an die Methode von Chirgwin et al. (1979) im Cäsiumchlorid-Kissen. Hierbei wurde jeweils ein Pellet aus ca. 10^7 Zellen in 3 ml Lysispuffer (4 M Guanidinium Isocyanat, 25 mM Natriumcitrat pH 7,0; 0,1 M beta-Mercaptoäthanol) aufgelöst und dieses Homogenat, zur Scherung großer DNS-Moleküle, bis zum Verlust der starken Viskosität mit Ultraschall beschallt. Anschließend wurde die Probe auf 2 ml einer autoklavierten Cäsiumchloridlösung (5,7 M) pipettiert und 18 - 22 Stunden in einer Ultrazentrifuge (Fa. Beckmann, L5-50, 40 000 Upm, Rotor SW 50,1; Becher 34,9; 15°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 300 µl autoklaviertem destilliertem Wasser (mit 0,1 % Diäthylpyrokarbonat (DEPC)) resuspendiert. Die Berechnung der Konzentration der RNS erfolgte über die Bestimmung der optischen Dichte (1 OD = 40 µg RNS/ml) bei 260 nm. Vor der Lagerung bei -70°C wurde die RNS mit Äthanol gefällt (vgl. DNS-Extraktion).

3.16. RNS-Gelelektrophorese, Northern-Blot

10 µg der Äthanolgefällten RNS wurden abzentrifugiert (30 min, 2°C, 10000 Upm), mit 70 %igem Alkohol gewaschen und nochmals, 20 min, abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet 5 Minuten lyophilisiert, zur Denaturierung der RNS mit 8 µl einer Glyoxilierungsmischung (siehe Anhang 12) (McMaster und Carmichael, 1977) versetzt, und 60 Minuten bei 50°C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde 2 µl Ladepuffer (50 % Glyzerol, 0,01 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0; 0,4 % Bromphenolblau) hinzugefügt und die Probe auf ein 1 %iges Agarosegel (60 ml, 11 x 14 cm) aufgetragen.

Als Längenstandard wurde radioaktiv-markierter- und unmarkierter LS II verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte 3 - 4 Stunden bei 70 Volt unter Verwendung einer 0,01 M Natriumphosphatlösung, pH 7,0, als Laufpuffer. Zur Gewährleistung eines konstanten pHs (unter 8,0) mußte der Puffer während der gesamten Laufzeit mit einer Pumpe von der Anode zur Kathode umgewälzt werden. Die Übertragung auf Biodyne Filter (Fa. Pall) konnte ohne weitere Behandlung des Gels erfolgen. Geblottet wurde wieder über Nacht unter Verwendung von 20x SSC und 3MM Chromatographie-Papier. Nach der Trocknung bei Raumtemperatur wurde das Filter zwei Stunden bei 80°C "gebacken" und in eine Plastiktüte eingeschweißt. Zur Kontrolle des erfolgreichen RNS- Transfers konnte das verbleibende Gel mit Acridinorange (30 µg/ml Aqua dest.) angefärbt und unter UV-Licht kontrolliert werden.

3.17. Direkte Übertragung von RNS und DNS auf Filter (Slot Blot)

1, 3 und 5 µg RNS bzw. 1 und 3 µg DNS in 10 µl DEPC-Wasser wurden mit jeweils 6 µl 20x SSC und 4 µl 37% igem Formalin versetzt. Die Denaturierung der DNS (10 Min., 95°C) erfolgte vor, die Denaturierung der RNS (15 Min., 60°C) nach Zugabe von SSC und Formalin. Anschließend wurden die Proben direkt durch die Schlitze eines Minifold-II-Apparates (Schleicher und Schuell) auf Biodyne Filter aufgetragen. Die vollständige Übertragung erfolgte durch den Anschluß des Gerätes an die Vakuum Wasserstrahl-Pumpe. Danach wurde das Filter bei Raumtemperatur getrocknet, eine Stunde bei 80°C "gebacken" und eingeschweißt.

3.18. Nukleinsäurehybridisierung

Zur Erkennung von viralen Sequenzen in den elektrophoretisch aufgetrennten DNS-Fragmenten wurde ein 400 bp langes SmaI - SmaI DNS-Fragment des AKV Virus (Abschnitt zwischen 6,6 und 7,0 kbp des endogenen ecotropen Provirus der AKR Maus; von U. Rapp, NCI, Bethesda, USA, zur Verfügung gestellt) verwendet (Lenz et al., 1982).

Zur Erkennung einer Amplifikation bzw. einer vermehrten Transkription des zellulären myc-Gens wurde das Plasmidinsert pSV-myc-1 verwendet. Dieses DNS-Fragment repräsentiert das zweite und dritte Exon des murinen c-myc-Gens (Land et al., 1983).

Die radioaktive Markierung der Proben erfolgte durch Nicktranslation (Rigby et al., 1977) mit einem Nicktranslations-Kit (Fa. Amersham). Der Ansatz (DNS, ^{32}P , dCTP, Nukleotide, Puffer, DNS-Polymerase I und DNase I) wurde nach Firmenvorschrift gemischt und eine Stunde bei 14°C, der optimalen Temperatur für die Enzymwirksamkeit, inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend mit 10 μl 0,5 M EDTA, pH 8,0, gestoppt. Die Trennung der radioaktiv-markierten DNS von ungebundenen cNTPs (Desoxyribonukleotide) erfolgte in einer Chromatographiesäule über Bio Gel p60 (Fa. Bio Rad) in 1x TE. Die spezifische Aktivität der DNS-Probe wurde über die Zerfallsmessung im Szintillationszähler (Fa. Kontron) ermittelt.

Das Filter mit den zu untersuchenden DNS-Fragmenten wurde nach dem Anfeuchten mit 2x SSC zuerst mit einer Vorhybridisierungslösung (siehe Anhang 13) behandelt. 10 - 20 ml dieser Lösung wurden zum Filter in den Plastikbeutel pipettiert, mit eingeschweißt und 3 - 4 Stunden bei 42°C inkubiert.

Vor der Herstellung der Hybridisierungsmischung erfolgte eine Denaturierung der radioaktiv-markierten DNS durch ein 10-minütiges Erhitzen auf 95°C und anschließender Abkühlung auf 0°C.

Dann wurden eine Hybridisierungslösung (siehe Anhang 13) mit $2 - 4 \times 10^6$ cpm/ml ^{32}P -markierter DNS (entspricht ca. 5×10^8 cpm/ μg DNS) gemischt. Die Vorhybridisierungslösung wurde entfernt und das Filter mit 5 - 10 ml Hybridisierungslösung inkubiert (42°C, über Nacht). Anschließend wurden die Nitrozellulosefilter unter ständigem Schwenken zuerst mit 2x SSC, 0,5x Denhardt's Lösung (20°C, 30 Min.), anschließend mit 2x SSC, 0,1x Denhardt's Lösung (20°C, 3 x 5 Min.) und zuletzt mit 0,1x SSC, 0,1 % SDS (65°C, 2-4 x 15 Min.) gewaschen. Das Waschen der Biodyne Filter erfolgte erst mit 2x SSC, 0,1 % SDS (2 x 15 Min. 20°C) und dann mit 0,1x SSC, 0,1 % SDS (2 x 15 Min., 50°C-Wasserbad). Die Autoradiographie wurde bei -70°C für 1 - 21 Tage, unter Verwendung von Röntgenfilmen (Kodak XAR-5) und Verstärkerfolien, durchgeführt.

Vor einer erneuten Hybridisierung der Biodyne Filter mit einer anderen DNS-Probe erfolgte eine Dehybridisierung. Hierfür wurde zuerst eine Stunde bei 65°C mit einer 10 mM Natriumphosphatlösung, pH 6,5, und 50 % Formamid inkubiert. Anschließend wurde mit 2x SSC und 0,1 % SDS gewaschen (15 Min., 20°C). Die Dehybridisierung konnte durch Autoradiographie kontrolliert werden.

4. ERGEBNISSE

4.1. Virusinfektion von Osteoblastenzellen und Etablierung von OA MuLV-infizierten Osteoblastenzelllinien

Das murine C-Typ Retrovirus OA MuLV induziert Osteome und Osteopetrose. Diese pathologischen Veränderungen der Skelettzellen zeigen sich im Versuchstier 8 - 16 Monate nach der Infektion. Da sich nach der "in vitro" Infektion von osteogenen Zellen ein Viruseffekt möglicherweise ebenfalls erst nach einer längeren "in vitro" Latenzzeit ausbilden könnte, wurden Osteoblastenzellen nach der OA MuLV-Infektion im 3T3-Schema (Todaro und Green, 1963) weitergezüchtet.

Die OA MuLV-Infektion der permanenten Osteoblastenzellen (MC3T3-CH₁) erfolgte durch eine mehrmalige Infektion mit Zellkulturüberstand (Infektionstiter ca. 10 infektiöse Partikel/ MC3T3-CH₁-Zelle) von einer OA MuLV-produzierenden Zellkultur. Die Infektion wurde durch die Markierung von viralem p30 Protein mit der Immunperoxidasemethode nachgewiesen. Nach der ersten Infektion wurden in ca. 70 % der Osteoblastenzellen p30 Protein gefunden (Abb. 1). Nach weiteren fünf Infektionen mit OA MuLV-haltigem Zellkulturüberstand innerhalb von 60 Stunden waren 100 % der Zellen p30 positiv.

Die erste Passage nach der letzten Infektion wurde als Passage Nr. 1 der MC3T3-CH₁-OA-Zellen gerechnet. Während der weiteren "in vitro" Kultivierung wurden die OA MuLV-infizierten Osteoblastenzellen regelmäßig auf ihre Tumorigenität "in vivo" untersucht.

In der 23. Zellkulturpassage wuchsen die MC3T3-CH₁OA-Zellen nach der Injektion in syngene Mäuse erstmals zu Tumoren aus. In weiteren Versuchen erwiesen sich diese Osteoblastenzellen als stabil tumorigene OA MuLV-infizierte Zellen (MC3T3-CH₁-OA t.).

Zur genaueren Untersuchung der Viruseffekte, die im Laufe mehrerer Zellkulturpassagen zur Transformation von Osteoblastenzellen durch OA MuLV geführt hatten, wurden in einem zweiten Experiment erneut MC3T3-CH₁-Zellen nach demselben Vorgehen wie beim 1. Experiment mit dem murinen OA Virus infiziert. Wieder galt die erste Passage nach Nachweis von viralem p30 Protein in allen Zellen der Kultur als Passage Nr. 1.

Diese zweite OA MuLV-infizierte Osteoblastenzelllinie wurde in regelmäßigen Abständen auf Veränderungen bezüglich Morphologie, Proliferation, osteogener Differenzierung "in vitro" und auf Tumorigenität "in vivo" untersucht. Als Vergleichszellen dienten nicht infizierte MC3T3-CH₁-Zellen, FBR MSV-transformierte MC3T3-CH₁-Zellen und die tumorigenen OA MuLV-infizierten Osteoblastenzellen aus dem ersten Experiment.

Im zweiten Experiment wurden die infizierten Zellen ab der 1. Zellkulturpassage in zwei Linien getrennt kultiviert. Die im folgenden beschriebenen Untersuchungen wurden an einer der zwei Linien durchgeführt. Nur für einige molekularbiologischen Untersuchungen wurde auch die zweite Linie verwendet.

4.2. Einfluß der Virusinfektion auf Zellmorphologie, Zytoskelett und extrazelluläre Matrix

Nicht infizierte MC3T3-CH₁-Kontrollzellen und frisch infizierte MC3T3-CH₁-OA-Zellen zeigten im konfluenten Stadium eine mehr epitheloid-polygonale Zellform. Mit zunehmender Passagezahl kamen bei den OA MuLV-infizierten Osteoblastenzellen einerseits gehäuft Riesenzellen vor und andererseits zeigten die Zellen ein mehr fibroblastenartiges, teilweise spindelförmiges Aussehen. In sehr dichten Kulturen war auch ein sogenanntes "criss-cross" Wachstum zu erkennen.

Eine Unterscheidung der infizierten MC3T3-CH₁-OA-Zellen von den tumorigenen MC3T3-CH₁-OA-Zellen war nur in konfluenten Kulturen möglich. In diesem Stadium zeigten die MC3T3-CH₁-OA t.-Zellen typische "Löcher" im Zellrasen. Die FBR MSV-transformierten Zellen waren alle spindelförmig und zeigten auch bei größtmöglicher Zelldichte nur eine gitterartige Verteilung der Einzelzellen. Vor Erreichen eines konfluenten Zellrasens lösten sich die Zellen regelmäßig vom Untergrund ab (Abb. 2).

Die Untersuchung des mit Phalloidin markierten Zytoskeletts ergab eine unterschiedliche Verteilung der Aktinfilamente in den verschiedenen Zellen. Nicht infizierte MC3T3-CH₁-Zellen zeigten eine gleichmäßige Verteilung der Mikrofilamente über die gesamte Zelle (Abb. 3a), MC3T3-CH₁-OA-Zellen in hohen Passagen und tumorigene MC3T3-CH₁-OA-Zellen hatten bereits einen hohen Anteil an depolymerisierten Filamenten und punktförmige Ablagerungen des Proteins (Abb. 3b). Sie ähnelten somit schon weitgehend transformierten Zellen. Die FBR MSV-transformierten Zellen hatten ein vollständig depolymerisiertes Zytoskelett (Abb. 3c).

Die immunhistochemische Markierung des Fibronektins zeigte ebenfalls erhebliche Unterschiede in Menge und Verteilung dieses Glykoproteins der extrazellulären Matrix in den verschiedenen Zellkulturen.

MC3T3-CH₁-Kontrollzellen und infizierte MC3T3-CH₁-OA-Zellen in niedrigen Passagen hatten eine gleichmäßige Fibronektinverteilung über die Zellmembran (Abb. 4a), wohingegen MC3T3-CH₁-FBR-Zellen teilweise punktförmige Ablagerungen auf der Zelle hatten und eine unregelmäßige Vernetzung der Zellen untereinander zeigten (Abb. 4d). Die infizierten MC3T3-CH₁-OA-Zellen in hohen Passagen zeigten neben der unregelmäßigen Verteilung von Fibronektin auch eine mengenmäßige Erhöhung des Matrixproteins (Abb. 4b).

In der tumorigenen MC3T3-CH₁-OA-Zellkultur konnten nach der Fibronektinmarkierung Einzelzellen kaum mehr unterschieden werden, es war nur mehr eine netzartige Verteilung des hoch exprimierten Proteins um die Zellen zu erkennen (Abb. 4c).

4.3. Einfluß der Virusinfektion auf den absoluten Klonbildungswert und auf das Zellwachstum

Der absolute Klonbildungswert bzw. die "plating efficiency" einer Zellkultur gibt an, wieviel Prozent der in Kulturschalen eingesäten Zellen an die Substratunterlage anhaften und zu klonalen Kolonien auswachsen. Der Klonbildungswert der tumorigenen OA MuLV-infizierten MC3T3-CH₁-Zellen lag bei 47 %, der von nicht infizierten Osteoblastenzellen lag während des gesamten Untersuchungszeitraums konstant bei 45 bis 55 % und der von FBR MSV-transformierten Osteoblastenzellen bei 15 bis 20 %. Der Klonbildungswert der OA MuLV-infizierten MC3T3-CH₁-Zellen des zweiten Experiments lag bis zum Zeitpunkt der 40. Zellkulturpassage bei etwa 25 %. Ab der 50. Passage konnte eine Erhöhung des Wertes auf ungefähr 50 % festgestellt werden (Abb. 5). Mit Erhöhung der Anheftungsrate konnte subjektiv auch die Notwendigkeit einer verlängerten Einwirkzeit der Trypsinlösung für die Ablösung des Zellrasens im Rahmen der Zellkulturpassage festgestellt werden.

In Abb. 6a ist das absolute Wachstum, in Abb. 6b das relative Wachstum der MC3T3-CH₁-OA-Zellen (in verschiedenen Passagestadien) im Vergleich zu nicht infizierten Zellen dargestellt.

Mit der Erhöhung der Anzahl der Zellkulturpassagen war eine Beschleunigung des Zellwachstums feststellbar. Frisch infizierte Zellen (3. Passage) zeigten am 3. Tag nach Einsaat nur eine etwa 30 %ige Steigerung des relativen Wachstums, in der 22. bzw. 51. Passage konnte bereits eine 60 %ige bzw. 160 %ige Wachstumserhöhung gegenüber den Kontrollzellen gefunden werden.

Abb. 7 zeigt den Vergleich des relativen Wachstums der nicht infizierten Kontrollzellen, der infizierten MC3T3-CH₁-OA-Zellen (81. Passage), der tumorigenen MC3T3-CH₁-OA-Zellen und der mit dem FBR MSV transformierten Osteoblastenzellzellen.

Die OA MuLV-infizierten Osteoblastenzellen aus dem zweiten Experiment zeigten ab dem 1. Tag nach Einsaat das langsamste Wachstum der virusinfizierten Kulturen. Da die Anheftungsraten der Zellkulturen die anschließende Proliferation der Zellen mit beeinflussen, lag die Kurve des relativen Wachstums der tumorigenen OA MuLV-infizierten Osteoblasten bis zum teilweisen Ablösen der Zellen von den Kulturschalen zwischen dem 3. und 5. Tag über der von FBR MSV-transformierten Zellen.

Die für die verschiedenen Zellkulturen während des logarithmischen Wachstums (1. - 3. Tag nach Zelleinsaat) berechneten Zellverdoppelungszeiten sind im folgenden:

MC3T3-CH ₁	: 25,8 Stunden
MC3T3-CH ₁ -OA, 81. Passage	: 13,5 Stunden
MC3T3-CH ₁ -OA, tumorigen	: 12,7 Stunden
MC3T3-CH ₁ -FBR	: 10,4 Stunden

4.4. Einfluß der Virusinfektion auf die Expression alkalischer Phosphatase

Die Expression alkalischer Phosphatase (ALP) in Osteoblastenzellen ist ein wichtiger Marker dieses Zelltyps und kann als Maßstab osteogener Differenzierung "in vitro" gewertet werden.

Bei der histochemischen Untersuchung der Osteoblastenzellkulturen waren in der MC3T3-CH₁-Kontrollzellkultur 5 Tage nach Einsaat über 10 %, 10 Tage nach Einsaat über 50 % der Zellen ALP-positiv. OA MuLV-infizierte MC3T3-CH₁-Zellen zeigten mit zunehmender Passagenzahl eine zunehmend geringere Anzahl ALP-positiver Zellen. In der tumorigenen MC3T3-CH₁-OA-Zellkultur und in der transfor-

mierten MC3T3-CH₁-FBR-Zellkultur konnten weder 5 noch 10 Tage nach Einsaat ALP-positive Zellen gefunden werden (Tab. 1 und Abb. 8).

Der quantitative Nachweis der ALP-Aktivität zeigte jeweils 10 Tage nach Einsaat ebenfalls erhebliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelllinien. Die spezifische Aktivität der alkalischen Phosphatase der MC3T3-CH₁-OA-Zellen (54. Zellkulturpassage) war gegenüber den uninfizierten Kontrollen etwa 3-fach erniedrigt; die der tumorigenen MC3T3-CH₁-OA-Zellen war etwa 6-fach erniedrigt. In den FBR MSV-transformierten Osteoblastenzellen konnte keine Enzym-Aktivität gefunden werden (Tab. 2).

4.5. Einfluß der Virusinfektion auf das Wachstum in Weichagar-Medium

Die Fähigkeit von Einzelzellen in Weichagar-Medium zu Kolonien auszuwachsen gilt als Hinweis für ihre tumorigene Potenz.

OA MuLV-infizierte MC3T3-CH₁-Zellen zeigten bis einschließlich der 51. Passage kein Wachstum in Weichagar-Medium. In der 76. Passage wuchsen erstmals 18 Kolonien bei einer Einsaat von 10⁴ Zellen/ 10 cm Petrischale zu Kolonien aus. In der 104. Passage waren es bereits 29, in der 110. Passage konnten 28 Kolonien bei Einsaat von 10³ Zellen und über 100 Kolonien bei Einsaat von 10⁴ Zellen gezählt werden. Die tumorigenen MC3T3-CH₁-OA-Zellen und die transformierten MC3T3-CH₁-FBR-Zellen entwickelten über 100 Kolonien bei Einsaat von 10³ Zellen und über 1000 Kolonien bei Einsaat von 10⁴ Zellen.

Die Größe der ausgewachsenen Zellkolonien unterschied sich erheblich. Der Durchmesser der Kolonien der FBR MSV-transformierten Osteoblastenzellen war um ein 3- bis 5-faches größer als der der tumorigenen MC3T3-CH₁-OA-Zellen und um ein 5- bis 10-faches größer als jener der infizierten

MC3T3-CH₁-OA-Zellen in hohen Passagen. Die nicht infizierten Osteoblastenzellen vermehrten sich im Weichagar-Medium nicht (Abb. 9 und Tab. 3).

4.6. Tumorigenität OA MuLV-infizierter permanenter Osteoblastenzellen

Zum Nachweis der Tumorigenität OA MuLV-infizierter permanenter Osteoblastenzellen "in vivo" wurden jeweils 2×10^6 Zellen in Mäuse subkutan injiziert. Die im ersten Experiment infizierten MC3T3-CH₁-OA-Zellen zeigten vier Zellkulturpassagen nach der Infektion mit OA MuLV kein malignes Wachstum in neugeborenen C57BL/6 Mäusen. Mit zunehmender Kultivierung "in vitro" wuchsen die Zellen jedoch vermehrt zu Tumoren aus. Bei den Tumoren handelte es sich um spindelzellige Sarkome, welche subkutan an der Injektionsstelle entstanden waren. Ein Sarkom, welches durch die tumorigenen MC3T3-CH₁-OA-Zellen induziert worden war, hatte einen Osteoidherd ausgebildet. Die in dem zweiten Experiment infizierten Osteoblastenzellen zeigten bis einschließlich zur 104. Passage keine Tumorigenität "in vivo".

Die Injektion von FBR MSV-transformierten Osteoblastenzellen rief bei drei von vier Tieren innerhalb von 22 Tagen ein Fibrosarkom hervor. Bei dem vierten Tier bildete sich nach 63 Tagen ein chondroblastisches Osteosarkom aus.

Die permanenten nicht infizierten Osteoblastenzellen wurden seit Jahren und auch parallel zu diesem Experiment auf Tumorigenität getestet. Bei keinem der Versuche konnte eine Tumorinduktion durch diese Zelllinie gefunden werden (Tab. 4 und Abb. 10).

4.7. Analyse des Virusintegrationsmusters OA MuLV- infizierter permanenter Osteoblastenzellen

Zelluläre DNS aus dem Thymus von C57BL/6 Mäusen, aus MC3T3-CH₁-Kontrollzellen und aus OA MuLV-infizierten MC3T3-CH₁-Zellen wurde nach der Isolierung mit Restriktionsenzymen verdaut, die Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt und nach der Übertragung auf Nitrozellulosefilter mit einer radioaktiv markierten Probe für ecotrope murine Leukämieviren hybridisiert.

Abb. 11 zeigt die Restriktionsenzymanalyse nach dem Eco RI- und Sac I-Verdau von zellulärer DNS aus dem Thymus von C57BL/6 Mäusen und aus der permanenten MC3T3-CH₁-Zelllinie, welche aus Calvarienzellen der C57BL/6 Maus etabliert worden war.

Das Restriktionsenzym Eco RI schneidet nur außerhalb des viralen Genoms, wohingegen das Restriktionsenzym Sac I eine Schnittstelle im pol-Gen des Virusgenoms hat. Sowohl die zelluläre Thymus-DNS als auch die der permanenten Osteoblastenzelllinie zeigten ein identisches Muster der Kopie des endogenen ecotropen Provirus der C57BL/6 Maus.

Die DNS der OA MuLV-infizierten Gesamtkultur zeigte nach dem Verdau mit dem Restriktionsenzym Sac I in der 4. und 13. Passage nach der Infektion außer dem endogenen Provirus keine zusätzliche Bande, obwohl alle Zellen infiziert waren. Dies rührte daher, daß die OA Viren in allen Zellen an jeweils unterschiedlichen Stellen integriert waren und somit von jeder zellulären DNS nach dem Restriktionsenzymverdau unterschiedliche virustragende Fragmente entstanden waren. Eine Bande als Hybridisierungssignal kann im Southern Blot erst entdeckt werden, wenn ein großer Teil der Zellen das gleiche Integrationsmuster und somit die gleichen Restriktionsfragmente aufweisen.

Dies kann nach der Wahrscheinlichkeit nicht zufällig auftreten, sondern nur wenn sich eine Zelle mit einem bestimmten Integrationsmuster, zum Beispiel durch höhere Proliferationsraten, durchsetzt. Nach 41 Zellkulturgenerationen konnten in der DNS der OA MuLV-infizierten Gesamtkultur neben dem endogenen Provirus zusätzliche Proviren gefunden werden, die im Anschluß konstant blieben (Abb. 12). Das ist ein Beweis für das klonale Wachstum einer Zelle, die gegenüber den anderen Zellen der Population Wachstumsvorteile besitzt.

Um zu zeigen, daß die frisch mit OA MuLV infizierte Osteoblastenkultur Zellen mit unterschiedlichen Integrationsmustern enthält, wurden kurz nach der Infektion mehrere Zellklone aus der Gesamtkultur einzeln vermehrt und drei zufällig gewählte Klone im Southern Blot untersucht. Die Eco RI- und Sac I- Restriktionsenzymanalyse zeigte, daß in allen drei Zellklonen mehrere zusätzliche Virusintegrationen an jeweils unterschiedlichen Stellen in der zellulären DNS vorhanden waren (Abb. 13).

Jede Bande zeigte nach dem Eco RI-Restriktionsenzymverdau eine Größe von mehr als 9,4 kbp und deutete somit auf das Vorhandensein vom kompletten Virusgenom hin. Nach dem Sac I-Restriktionsenzymverdau kamen auch Fragmente vor, die kleiner als 9,4 kbp waren, da dieses Enzym eine Schnittstelle im Virusgenom hat.

In der ab der 1. Passage zusätzlich parallel gehaltenen MC3T3-CH₁-OA-Zellkultur konnten in der 41. Passage ebenfalls zusätzliche Virusintegrationen festgestellt werden, welche sich ebenso in weiteren Untersuchungen als stabil integriert erwiesen. Das Integrationsmuster dieser parallel gehaltenen OA MuLV-infizierten Osteoblastenzellkultur unterschied sich aber sowohl von dem der anderen MC3T3-CH₁-OA-Kultur als auch von dem der tumorigenen MC3T3-CH₁-OA-Kultur.

Aus diesen Analysen wurde ersichtlich, daß die Infektion der Osteoblastenzellkultur mit dem murinen OA Leukämievirus anfangs zu zufällig verteilten Integrationen viraler Genome in die zelluläre DNS geführt hatte.

Bei weiterer Kultivierung kam es zur klonalen Selektion jeweils einer Zellpopulation mit einem einheitlichen Virusintegrationsmuster.

Aus der tumorigenen MC3T3-CH₁-OA-Zelllinie wurden ebenfalls mehrere Zellklone einzeln vermehrt. Der Restriktionsenzymverdau mit Eco RI und Sac I ergab bei fünf zufällig herausgegriffenen Klonen ein jeweils identisches Integrationsmuster (Abb. 14). Ebenso hatte die DNS der durch diese Zelllinie hervorgerufenen Tumoren (86/257, 86/258) und die DNS von erneut aus Tumoren etablierten Zelllinien (MC3T3-CH₁-OA t. TZ I und II) das identische Integrationsmuster (Abb. 15).

4.8. Analyse der Transkription des zellulären myc-Gens

Zelluläre DNS und RNS aus MC3T3-CH₁-Osteoblastenzellen, aus zwei OA MuLV-infizierten und aus OA MuLV-infizierten tumorigenen MC3T3-CH₁-Zelllinien wurde nach der Denaturierung auf Biodyne Filter aufgetragen (Slot Blot) und mit einer radioaktiv markierten Probe des murinen c-myc-Gens hybridisiert.

Die Intensitäten der DNS-Banden der verschiedenen Zelllinien unterschieden sich kaum, d.h. das zelluläre myc-Gen kam in keinem der Zellgenome häufiger z. B. amplifiziert vor.

Die Intensität der RNS-Bande der tumorigenen MC3T3-CH₁-Zelllinie war dagegen nach der Hybridisierung mit dem c-myc-Gen annähernd 8-fach (Vergleich der integrierten Flächen nach der Auswertung der Banden mit dem Laser-Densitometer) stärker als die der anderen drei Zelllinien. Dies zeigt eine Überexpression dieses Gens an. Als Hybridisierungsprobe diente das Plasmidinsert pSV-myc-1 (Abb. 16).

Nach der Autoradiographie wurden die Filter dehybridisiert und zur Kontrolle der aufgetragenen RNS-Mengen mit einer Aktinprobe hybridisiert. Die Banden der verschiedenen Zelllinien zeigten bei den entsprechenden Auftragsmengen die gleiche Intensität, d.h. die vorne genannten Intensitätsunterschiede beruhten nicht auf unterschiedlich aufgetragene RNS-Mengen.

In der elektrophoretisch aufgetrennten RNS der untersuchten Zelllinien konnte man nach der Übertragung auf Nitrozellulosefilter (Northern Blot) und der anschließenden Hybridisierung mit dem murinen c-myc-Gen ein einziges intensives Signal sehen. Diese Bande war in der aufgetrennten RNS der tumorigenen OA MuLV-infizierten Osteoblastenzellen im Bereich zwischen 2,0 und 2,5 kbp zu erkennen.

5. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt eines knochenpathogenen Retrovirus der Maus (OA MuLV) auf die Morphologie, das Wachstum, die Differenzierungsfähigkeit und die tumorigene Potenz von Osteoblastenzellen (MC3T3-CH₁) untersucht.

Im ersten Experiment führte die Infektion von MC3T3-CH₁-Zellen mit dem OA MuLV bereits bis zur 23. Zellkulturgeneration nach der Virusinfektion zu einer tumorigenen Zellkultur (MC3T3-CH₁-OA t.), d.h. die Zellen hatten die Fähigkeit erlangt Kolonien im Weichagar-Medium auszubilden sowie nach Injektion in neugeborene Mäuse zu Tumoren auszuwachsen. Mit Erreichen der tumorigenen Potenz zeigten diese MC3T3-CH₁-OA t.-Zellen eine veränderte Morphologie, ein verändertes Zytoskelett, erhöhte Zellmatrixproduktion, hohe Proliferationsraten und eine verminderte Differenzierungsfähigkeit.

Das spindelförmige Aussehen der tumorigenen OA MuLV-infizierten Osteoblastenzellen und auch das enge Wachstum der Zellen nebeneinander und übereinander ("criss cross") durch Verlust der Kontaktinhibition war dem von FBR MSV-transformierten Zellen sehr ähnlich.

Sowohl die malignen MC3T3-CH₁-OA-Zellen als auch die zum Vergleich herangezogenen FBR MSV-transformierten MC3T3-CH₁-Zellen zeigten nach der Phalloidinmarkierung des Zytoskeletts depolymerisierte Stützfilamente und unregelmäßige Aktinverteilungen in der Zelle. Diese morphologischen Veränderungen sind von akut transformierten Zellen bekannt (Borek, 1979; Pollack et al., 1975). In Zellen, welche durch ein Retrovirus ohne Onkogen infiziert worden sind, sind dies neue Beobachtungen.

Im Widerspruch zu den Eigenschaften virustransformierter Zellen stand jedoch die hohe Fibronektinexpression der MC3T3-CH₁-OA t.-Zellen.

Das Erlangen der tumorigenen Potenz dieser Zellen könnte mit den vorne genannten Veränderungen des Zytoskeletts und des Fibronektinmusters gesehen werden. Für das Auswachsen der injizierten Zellen zu Tumoren könnte neben hohen Zellteilungsraten eine bestimmte Menge und Verteilung von Fibronektin und Aktin notwendig gewesen sein (Pollack et al., 1975; Hedberg und Chen, 1986).

Trotz der stark erhöhten Fibronektinproduktion in den tumorigenen MC3T3-CH₁-OA-Zellen lag der absolute Klonbildungswert dieser Zellen nur bei ca. 50 % und war somit dem von nicht infizierten Osteoblastenzellen ähnlich. Die Anheftung der Zellen an die Substratunterlage wird also nicht nur von der Fibronektinexpression beeinflusst, sondern auch andere Parameter, wie hohe Proliferationsraten, scheinen eine Rolle zu spielen (Yamada et al., 1978a, 1978b).

Die Wachstumsgeschwindigkeit der malignen OA MuLV-infizierten Osteoblastenzellen war mit der von FBR MSV-transformierten Osteoblastenzellen zu vergleichen.

Die Kurve des relativen Zellwachstums der tumorigenen MC3T3-CH₁-OA-Zellen zeigt ein ähnliches Aussehen wie die der MC3T3-CH₁-FBR-Zellen, nur ist sie durch die annähernd drei mal so große Anheftungsrate (absoluter Klonbildungswert) der Zellen bei Einsaat parallel nach oben verschoben. Die errechnete Zellverdoppelungszeit der tumorigenen OA MuLV-infizierten Osteoblastenzelllinie während des logarithmischen Wachstums liegt nur etwa zwei Stunden unter der der FBR MSV-transformierten Zelllinie. Die Untersuchung der osteogenen Differenzierungsfähigkeit anhand der quantitativen Analyse der Aktivität der alkalischen Phosphatase (Kodama et al., 1981; Sudo et al., 1983) zeigte, daß die malignen MC3T3-CH₁-OA-Zellen die Fähigkeit zur Expression dieses Markerenzym nicht ganz verloren hatten. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase liegt mit 0,03 Einheiten/ mg Protein ca. 80 % unter dem Wert von nicht infizierten Osteoblastenzellen. In den FBR MSV-transformierten MC3T3-CH₁-Zellen konnte dagegen keine Enzym-Aktivität mehr gemessen werden.

Für verschiedene Zellkultursysteme ist eine Dedifferenzierung von Zellen nach der Transformation mit onkogen-tragenden Sarkomviren bekannt (Pacifici et al., 1977; Yoshimura et al., 1981; Schmidt et al., 1987), die Verminderung der Differenzierungsfähigkeit mesenchymaler Zellen nach der Infektion mit einem Retrovirus ohne Onkogen wurde bisher nicht beobachtet.

Im Widerspruch zu der beobachteten Dedifferenzierung "in vitro" steht jedoch die Ausbildung eines Osteoidherdes im Zentrum eines durch die malignen MC3T3-CH₁-OA-Zellen induzierten Tumors. Die Induktion eines Tumors mit unterschiedlich differenzierten Arealen durch die Transplantation von osteogenen Zellen oder Gewebe, welche "in vitro" transformiert worden waren, ist auch von Schmidt et al. (1986) beschrieben worden.

Die Untersuchung der Fähigkeit der Zellen zum Wachstum in Weichagar-Medium durch Auszählen der ausgewachsenen Zellkolonien und Größenvergleich der Kolonien zeigte, daß die tumorigenen MC3T3-CH₁-OA-Osteoblastenzellen annähernd die gleiche Anzahl an Kolonien ausbildeten, wie die FBR MSV-transformierten Osteoblastenzellen. Der Durchmesser der Kolonien der FBR MSV-transformierten Zellen war jedoch durchschnittlich dreimal so groß wie der Durchmesser der Kolonien der tumorigenen MC3T3-CH₁-OA-Zellen.

Die Injektion der tumorigenen, OA MuLV-infizierten Osteoblastenzellen in neugeborene C57BL/6 Mäuse führte zur Induktion von spindelzelligen Sarkomen, d.h. die Zellen der Tumoren waren den Zellen aus der Zellkultur morphologisch sehr ähnlich.

Die FBR MSV-transformierten Zellen induzierten neben Fibrosarkomen auch einen Tumor mit osteoiden und chondroiden Differenzierungsbereichen. Diese Tatsache steht ebenfalls im Widerspruch zu dem "in vitro" beobachteten Verlust der Differenzierungsfähigkeit dieser Zellen. Die Osteoidbildung der Zellen kann mit der Osteosarkominduktion durch die Viren selbst gesehen werden. Schließlich wurde das FBR MSV aus einem murinen Osteosarkom isoliert (Finkel et al., 1966; Finkel, 1975).

Der chondroide Teil des Tumors könnte die Folge der Aktivierung des Periosts der Skapula sein. Diese mögliche Ursache wird durch die Tatsache, daß der chondroide Teil des induzierte Tumors mit dem Schulterblatt fest verwachsen war, wahrscheinlicher. Eine derartige Möglichkeit wurde auch bei der Periostproliferation und Knochenmatrixbildung nach der intramuskulären Injektion des murinen Moloney-Sarkomvirus diskutiert (Wlodarski et al., 1981).

Die in einem zweiten Experiment mit dem OA MuLV infizierten Osteoblastenzellen (MC3T3-CH₁-OA) waren in den ersten Zellkulturpassagen morphologisch und funktionell von nicht infizierten Osteoblastenzellen kaum zu unterscheiden. Erst mit zunehmender Anzahl der Passagen zeigten sich einige Veränderungen in der OA MuLV-infizierten Osteoblastenzellkultur. Die veränderte Morphologie konnte vor allem im konfluenten Zustand der Zellkultur beobachtet werden. Die gehäuft auftretenden längsovalen bis spindelförmigen Zellen lagen dicht nebeneinander und wuchsen zum Teil auch übereinander (criss cross). Neben diesen kleineren Zellen wurde auch eine vermehrte Synzytienbildung gefunden. Dieser Ausdruck der Anaplasie der OA MuLV-infizierten Zellen könnte als erster Hinweis auf eine eventuelle Veränderung der Zellen in Richtung Tumorzelle gewertet werden. So werden in nahezu allen histologischen Präparaten unreifer mesenchymaler Tumoren Zellen gefunden deren Größe und Form erheblich voneinander abweichen. Von Erfle et al. (1979) wurde auch nach der Etablierung von Zelllinien aus Osteosarkomen spindelförmige Zellen und mehrkernige Riesenzellen beobachtet.

Eine weitere mögliche Erklärung für die vermehrte Synzytienbildung ist die Ausbildung eines zytopathischen Effekts (cpE), der durch die Virusinfektion bedingt ist. Eine durch murine C-Typ Retroviren (ohne Onkogen) induzierte Synzytienbildung wurde erstmals von Rowe et al. (1970) nach der Kokultivierung infizierter Zellen mit einer Rattensarkomzelllinie (XC-Zellen) gezeigt.

Die Phalloidinmarkierung des Zytoskeletts der MC3T3-CH₁-OA in hohen Passagen und der tumorigenen MC3T3-CH₁-OA-Zellen zeigte depolymerisierte Aktinfilamente und punktförmige Ablagerungen des Proteins in der Zelle. Auch konnte in den OA MuLV-infizierten Osteoblastenzellen des 2. Experiments mit zunehmender Anzahl der Zellkulturpassagen eine ansteigende Fibronectinexpression beobachtet werden. Allerdings erreichte die Menge der extrazellulären Matrix dieser Zellen (bis zur 69. Passage) nicht die der tumorigenen MC3T3-CH₁-OA-Zellen.

Die Erhöhung des absoluten Klonbildungswertes 40 Zellkulturpassagen nach der OA MuLV-Infektion auf Werte wie sie in nicht infizierten Osteoblastenzellen gefunden werden könnte in direktem Zusammenhang mit der Zunahme des gebildeten Fibronectins gesehen werden. Warum sich die Anheftungsrate in frisch infizierten Zellen zuerst verringert bleibt ungeklärt.

Die Wachstumsgeschwindigkeit der OA MuLV-infizierten Zellen erhöhte sich ebenfalls mit zunehmender Passagenzahl, die Proliferationsrate der tumorigenen MC3T3-CH₁-OA-Zelllinie wurde jedoch (bis zur 81. Zellkulturpassage) nicht erreicht. Eine Erhöhung der Zellteilungsrate wird in der Regel durch die Etablierung und somit Immortalisierung einer Zelllinie aus primären Zellen erreicht. Diesen Schritt, deren mögliche Ursachen bis heute ungeklärt sind, haben die verwendeten Osteoblastenzellen bereits hinter sich, da es sich hierbei um eine nach dem 3T3-Schema etablierte permanente Zelllinie handelt (Kodama et al., 1981; Todaro und Green, 1963). Eine nochmalige Erhöhung der Proliferationsrate von etablierten Zelllinien wird durch eine Zelltransformation erreicht. Eine retrovirusbedingte Transformation mit anschließender Wachstumsbeschleunigung ist bisher nur bei der Transformation von Zellen mit onkogentragenden Retroviren beschrieben worden (Aaronson und Rowe, 1970; Hartley und Rowe, 1974;). In den OA MuLV-infizierten Osteoblastenzellen löste ein C-Typ Retrovirus ohne Onkogen die beschleunigte Proliferation aus.

Die quantitative Untersuchung der alkalischen Phosphatase der MC3T3-CH₁-OA-Zellen in der 54. Zellkulturpassage zeigte, daß diese Zellen eine etwa 60 %ige Reduktion der Aktivität dieses Markerenzym im Vergleich zu nicht infizierten Osteoblastenzellen aufwiesen. Das ist ein Hinweis darauf, daß auch diese Zellen einen Teil ihrer Differenzierungsfähigkeit nach der Virusinfektion verloren hatten, allerdings war der Verlust nicht so groß wie der der tumorigenen OA MuLV-infizierten Osteoblastenzellen.

Diese zweite OA MuLV-infizierte Osteoblastenzellkultur, welche bis einschließlich zur 104. Zellkulturpassage kein Tumorstadium nach der Injektion dieser Zellen in syngene Tiere induzieren konnte, wuchs trotzdem in der 76. Passage erstmals zu Kolonien im Weichagar-Medium aus. Die Anzahl der Kolonien bei Einsaat von 10⁴ Zellen steigerte sich von 18 Kolonien in der 76. Passage bis über 100 Kolonien in der 110. Passage.

Eine mögliche Erklärung für die fehlende Tumorstadiumsfähigkeit trotz Fähigkeit zum Wachstum in Weichagar-Medium könnte die kurze Beobachtungszeit der Versuchstiere von nur 3 Monaten sein. Da die Weichagar-Kolonien der bisher nicht tumorigenen MC3T3-CH₁-OA-Zellen nach 3 Wochen nur etwa 10 % der Menge an Zellen wie die Kolonien der tumorigenen MC3T3-CH₁-OA-Zellen enthielten, ist es nicht auszuschließen, daß diese Zellen länger als 3 Monate benötigen um zu sichtbaren Tumoren auszuwachsen.

Alle getesteten Eigenschaften und Fähigkeiten, die für den Zustand "Tumorstadium" charakteristisch sind, haben sich in dieser OA MuLV-infizierten Osteoblastenzellkultur im Verlauf zunehmender Zellkulturpassagenzahl immer stärker entwickelt. Der Phänotyp der MC3T3-CH₁-OA-Zellen war mehr und mehr mit dem von transformierten Zellen bzw. dem der tumorigenen OA MuLV-infizierten Osteoblastenzelle vergleichbar.

Die molekularbiologischen Untersuchungen der Virusintegrationen in den OA MuLV-infizierten Osteoblastenzellen haben gezeigt, daß die Infektion mit einem knochenpathogenen Retrovirus eine klonale Selektion eines bestimmten Zelltyps in der Osteoblastenkultur zur Folge hatte. Die entstandenen klonalen Zellpopulationen zeigten jeweils einen spezifischen Virusintegrationstyp, der jedoch bei jeder infizierten Osteoblastenkultur ein unterschiedliches Muster hatte.

Die klonale Selektion einer Zelle mit einem einheitlichen Integrationsmuster weist darauf hin, daß die Integration eines oder mehrere Virusgenome in Stellen des Wirtsgenoms erfolgten, die die Regulation des Zellwachstums entscheidend beeinflussten. Die daraus resultierenden erhöhten Proliferationsraten und die erhöhten absoluten Klonbildungswerte der Zellen bei der Neueinsaat führten zu einem bestimmten Zelltyp, der innerhalb der infizierten Population deutliche Wachstumsvorteile besaß.

Welche Gene durch die Virusintegration letztlich direkt oder indirekt beeinflusst worden sind ist nicht bekannt. Es wird jedoch mehrfach beschrieben, daß das zelluläre myc-Gen bei der Zellproliferation und der Zelldifferenzierung eine entscheidende Rolle spielt. Ein aktiviertes c-myc-Gen kann eine Proliferation induzieren und die zelluläre Differenzierungsfähigkeit "in vitro" negativ beeinflussen (Lachman et al., 1985; Depinho et al., 1986). Eine Aktivierung dieses Gens durch Retroviren ist mehrfach beschrieben worden (Hayward et al., 1981; Corcorane et al., 1984). In den meisten dieser Untersuchungen wurde das integrierte Virusgenom in der Nachbarschaft des c-myc-Gens gefunden. Eine Genaktivierung durch weiter entfernt integrierte, auf einem anderen Chromosom lokalisierte Proviren (trans-Aktivierung), kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden.

Die Hybridisierung der RNS der OA MuLV-infizierten Osteoblastenzellen mit einer DNS-Probe des murinen c-myc-Gens zeigte, daß dieses Gen nur in den tumorigenen Zellen eine Überexpression im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollzellen aufweist. Die Hybridisierung der elektrophoretisch aufgetrennten RNS bestätigte dieses Ergebnis und zeigte zusätzlich, daß das Gen die für das murine c-myc-Gen bekannte Größe der mRNA transkribiert (Piechaczyk et al., 1987).

Da die nicht tumorigenen MC3T3-CH₁-OA-Zellen keine erhöhte c-myc-Expression aufweisen, kann gesagt werden, daß die Überexpression dieses Gens für die Veränderungen dieser Zellen nicht verantwortlich ist. Die erhöhte Zellproliferation und der teilweise Verlust der Differenzierungsfähigkeit scheint mit der transkribierten Menge des c-myc-Gens nicht zu korrelieren.

Von Sorrentino et al. (1987) ist beschrieben worden, daß ein zu hoher Expression fähiges c-myc-Gen, welches mittels eines retroviralen Vektors in das Genom von Zellen eingeführt worden war, zu einer Sensibilisierung der infizierten Zellen gegenüber transformierender Einflüsse geführt hatte. Im Falle der tumorigenen Osteoblastenzellen könnte eine Sensibilisierung der Zellen für eine Transformation durch die Aktivierung des zellulären myc-Gens durch die retrovirale Integration verursacht worden sein. Schließlich hatte sich der tumorogene Zustand der Zellen auch erst einige Zellkulturpassagen nach der Infektion mit dem OA MuLV manifestiert. In den nicht tumorigenen OA MuLV-infizierten Osteoblastenzellen scheint die OA MuLV-bedingte Transformation durch die fehlende Überexpression von c-myc unvollständig abzulaufen oder sich erst nach weiteren Passagen manifestieren zu können.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Permanente Osteoblastenzellen (MC3T3-CH₁) wurden mit einem knochenpathogenen Leukämievirus (OA MuLV), das Osteome und Osteopetrose induziert, infiziert.

Im 1. Experiment erlangte die mit OA MuLV infizierte Osteoblastenzelllinie nach einer "in vitro Latenzzeit" von 80 - 150 Zellgenerationen tumorogene Eigenschaften, d.h. die Injektion der infizierten Zellen in neugeborene syngene Mäuse führte zur Induktion von Sarkomen.

"In vitro" zeigten diese malignen Zellen eine starke morphologische und funktionelle Ähnlichkeit mit Zellen, die durch das murine FBR Osteosarkomvirus transformiert worden waren, allerdings exprimierten sie vermehrt extrazelluläres Matrixprotein.

Der transformierte Phänotyp dieser Osteoblastenzelllinie hatte sich also nach der Infektion mit einem Retrovirus ohne Onkogen im Laufe der anschließenden "in vitro" Kultivierung entwickelt.

Die im 2. Experiment mit OA MuLV infizierte Osteoblastenzelllinie zeigte mit zunehmender Zellkulturpassagenzahl zwar auch einige Eigenschaften transformierter Zellen, die Fähigkeit zur Tumorinduktion hatte sie jedoch auch nach etwa 700 Zellgenerationen nicht erreicht.

Die molekularbiologische Analyse ergab, daß es sowohl in der tumorigenen MC3T3-CH₁-OA-Zelllinie als auch in nicht tumorigenen MC3T3-CH₁-OA-Zelllinien nach einigen Wochen der "in vitro" Kultivierung zur klonalen Selektion eines einheitlichen, im direkten Vergleich jedoch unterschiedlichen Virusintegrationstyps gekommen war.

In der tumorigenen OA MuLV-infizierten Zelllinie wurde zudem eine erhöhte Transkription des zellulären myc-Gens gefunden.

SUMMARY

Infection of a permanent osteoblast-like cell line with bone-pathogenic leukemia virus: time course of functional and molecular events

Cells of the permanent osteoblast-like cell line MC3T3-E1 were infected with OA MuLV, a murine leukemia virus known to induce osteomas and osteopetrosis.

One osteoblast-like cell line infected with OA MuLV acquired tumorigenic properties after an "in vitro latent period" of 80 to 150 cell generations. Injection of infected cells into newborn syngeneic mice led to the induction of sarcomas. Morphological and functional similarities were found between the OA MuLV-infected cells and murine osteosarcoma virus- (FBR MSV) transformed cells. However, an increased expression of extracellular matrix protein was observed in the OA MuLV-infected osteoblasts. The transformed phenotype of the tumorigenic cell line was generated after infection with the non-acutely transforming murine leukemia virus and continuous cultivation "in vitro".

In a second experiment, osteoblast-like cells infected with OA MuLV increasingly exhibited features characteristic of transformed cells with advanced culture time yet they lacked "in vivo" tumorigenicity after 700 cell generations. Molecular analysis of both, OA MuLV infected non-tumorigenic and tumorigenic osteoblast-like cells revealed the clonal expansion of a cell type showing a uniform virus integration-pattern which differed between different infected cell lines.

Overexpression of c-myc-mRNA was found only in the tumorigenic OA MuLV-infected osteoblasts.

TABELLEN UND
ABBILDUNGEN

Tabelle 1. Einfluß der "in vitro" Kultivierung einer OA MuLV-infizierten permanenten Osteoblastenzelllinie auf die alkalische Phosphatase Aktivität.

Zellen	Zellkulturpassagen	ALP-positive Zellen, Tage nach Einsaat	
		5	10
MC3T3-CH ₁ -OA	3	+	++
MC3T3-CH ₁ -OA	12	+	++
MC3T3-CH ₁ -OA	22	+	++
MC3T3-CH ₁ -OA	33	+	+
MC3T3-CH ₁ -OA	41	-	+
MC3T3-CH ₁ -OA	54	+	+
MC3T3-CH ₁ -OA	59	-	+
MC3T3-CH ₁ -OA	81	-	+
MC3T3-CH ₁ -OA	104	-	-
Kontrollen:			
MC3T3-CH ₁	13 ^a	++	+++
MC3T3-CH ₁ -OA, tumorigen	14 ^b	-	-
MC3T3-CH ₁ -FBR	36 ^c	-	-

+ bis zu 10 % ALP-positive Zellen
 ++ 11 - 50 % ALP-positive Zellen
 +++ über 50 % ALP-positive Zellen

a, 13. Zellkulturpassage nach der Klonierung auf eine hohe Aktivität der alkalischen Phosphatase; vorherige Passagenzahl unbekannt, da permanente Zelllinie.

b, 14. Zellkulturpassage nach dem Nachweis der Tumorigenität "in vivo".

c, 36. Zellkulturpassage nach der Transformation mit dem murinen Sarkomvirus FBR MSV.

Tabelle 2. Spezifische alkalische Phosphatase Aktivität in
OA MuLV-infizierten, in FBR MSV-transformierten
und in nicht infizierten Osteoblastenzellen.

Zellen	ALP-Aktivität (E/mg Protein)
MC3T3-CH ₁	0,17
MC3T3-CH ₁ -OA (54. Passage)	0,06
MC3T3-CH ₁ -OA, tumorigen	0,03
MC3T3-CH ₁ -FBR	> 0,01

Tabelle 3. Wachstum OA MuLV-infizierter permanenter Osteoblastenzellen im Weichagar-Medium.

Zellen	Anzahl der Zellkulturpassagen	Wachstum bei Einzelzelleinsaat	
		von 10^3	10^4
MC3T3-CH ₁ -OA	3	-	-
MC3T3-CH ₁ -OA	12	-	-
MC3T3-CH ₁ -OA	22	-	-
MC3T3-CH ₁ -OA	33	-	-
MC3T3-CH ₁ -OA	41	-	-
MC3T3-CH ₁ -OA	51	-	-
MC3T3-CH ₁ -OA	76	-	+
MC3T3-CH ₁ -OA	104	-	+
MC3T3-CH ₁ -OA	110	+	++
Kontrollen:			
MC3T3-CH ₁	32 ^a	-	-
MC3T3-CH ₁ -OA, tumorigen	14 ^b	++	+++
MC3T3-CH ₁ -FBR	36 ^c	++	+++

+ unter 100 Kolonien/ Petrischale
 ++ 100 - 1000 Kolonien/ Petrischale
 +++ über 1000 Kolonien/ Petrischale

a, 32. Zellkulturpassage nach der Klonierung auf eine hohe Aktivität der alkalischen Phosphatase; vorherige Passagenzahl unbekannt, da permanente Zelllinie.

b, 14. Zellkulturpassage nach dem Nachweis der Tumorigenität "in vitro".

c, 36. Zellkulturpassage nach der Transformation mit dem murinen Sarkomvirus FBR MSV.

Tabelle 4. Tumorigenität OA MuLV-infizierter permanenter Osteoblastenzellen in neugeborenen C57BL/6 Mäusen.

Zellen	Zellkultur- passagen	Beobachtungs- zeitraum (Tage)	Tumorraten ^a
Experiment I:			
MC3T3-CH ₁ -OA	4	92	0/5
MC3T3-CH ₁ -OA	23	21	1/6 ^b
MC3T3-CH ₁ -OA	23	28	2/6
MC3T3-CH ₁ -OA	23	92	6/6
MC3T3-CH ₁ -OA	31	22	4/4
MC3T3-CH ₁ -OA	38	14	8/8
Experiment II:			
MC3T3-CH ₁ -OA	4	92	0/5
MC3T3-CH ₁ -OA	13	92	0/7
MC3T3-CH ₁ -OA	23	92	0/5
MC3T3-CH ₁ -OA	30	103	0/5
MC3T3-CH ₁ -OA	41	119	0/7
MC3T3-CH ₁ -OA	48	92	0/7
MC3T3-CH ₁ -OA	59	92	0/7
MC3T3-CH ₁ -OA	104	92	0/8
Kontrollen:			
MC3T3-CH ₁	13 ^c	223	0/3
MC3T3-CH ₁ -FBR	24 ^d	22	3/4
MC3T3-CH ₁ -FBR	24	63	4/4

a, Anzahl Tiere mit Tumor/ Anzahl untersuchter Tiere.

b, Zellen der 23. Passage wuchsen in einer Maus nach 21 Tagen, in einer zweiten Maus nach 28 Tagen zu Tumoren aus. Bei den restlichen vier Tieren wurden Tumoren erst am Untersuchungsende festgestellt.

c, 13. Zellkulturpassage nach der Klonierung auf eine hohe Aktivität der alkalischen Phosphatase.

d, 24. Zellkulturpassage nach der Transformation mit dem murinen Sarkomvirus FBR MSV.



Abb. 1.

Immunhistochemischer Nachweis von viralem p30 Protein in OA MuLV-infizierten Osteoblastenzellen.

- A, OA MuLV-infizierte Osteoblastenzellen (MC3T3-CH₁-OA), 12 Stunden nach der 1. Infektion: etwa 70 % der Zellen exprimieren virales p30 Protein (Pfeil); p30-negative Zellen sind unangefärbt (Pfeilköpfe), xl25.
- B, Nicht infizierte Osteoblastenzellen als negative Kontrolle, Phasenkontrast, xl25.

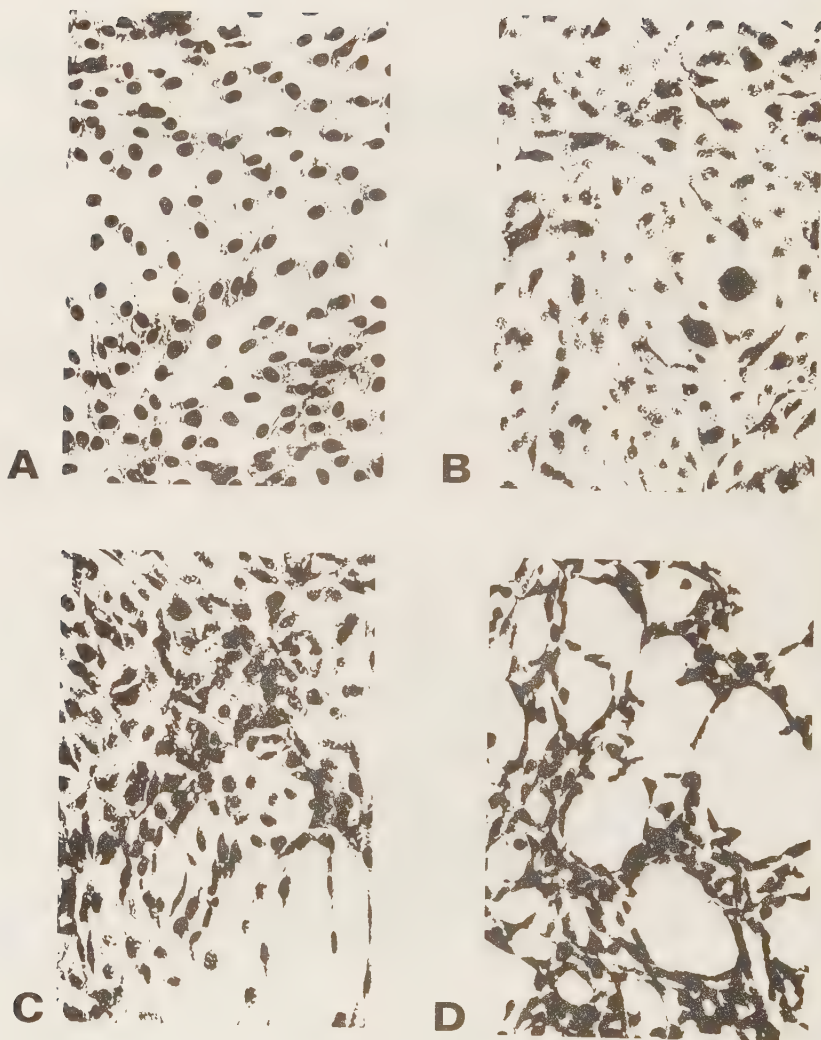


Abb. 2.

Morphologie OA MuLV-infizierter und FBR MSV-transformierter Osteoblastenzellen nach 5 Tagen in Kultur, Giemsaefärbung.

- A, MC3T3-CH₁-Kontrollzellen, x250;
- B, MC3T3-CH₁-OA, 110. Zellkulturpassage, x250;
- C, MC3T3-CH₁-OA, tumorigen, x250;
- D, MC3T3-CH₁-FBR, x250.

A



Abb. 3.

Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des Zytoskeletts von OA MuLV-infizierten und FBR MSV-transformierten Osteoblastenzellen im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollzellen. Die Aktinmarkierung wurde mit khodamin-markiertem Phalloidin durchgeführt.

- A, Aktinfilamente von MC3T3-CH₁-Kontrollzellen, x625;
- B, Aktinfilamente von MC3T3-CH₁-OA-Zellen, 69. Zellkulturpassage, x625;
- C, Aktinfilamente von MC3T3-CH₁-FBR-Zellen, x625.

B



C



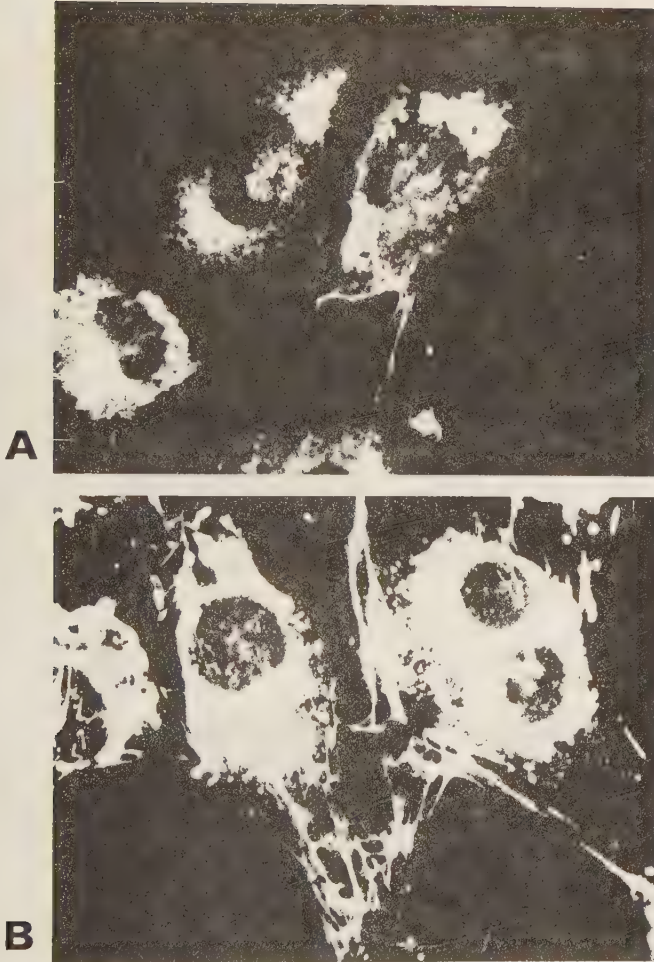
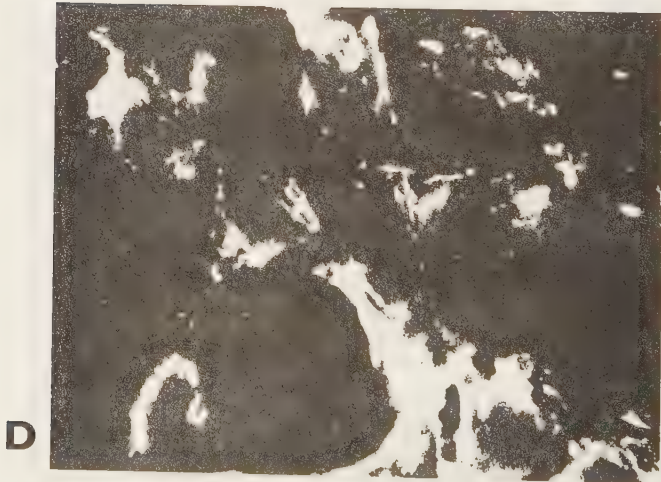
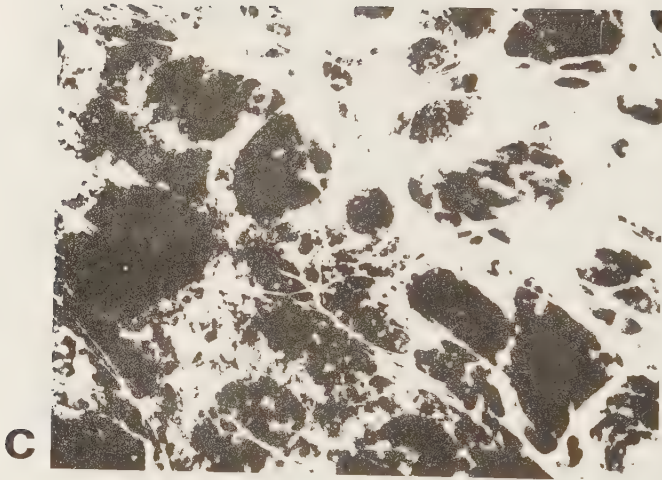


Abb. 4.

Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung der extrazellulären Matrix von OA MuLV-infizierten und von FBr MSV-transformierten Osteoblastenzellen im Vergleich zur nicht infizierten Kontrollzellkultur.

- A, Fibronectin von MC3T3-CH₁-Kontrollzellen, x625;
- B, Fibronectin von MC3T3-CH₁-OA-Zellen, 71. Zellkulturpassage, x625;
- C, Fibronectin von tumorigenen MC3T3-CH₁-OA-Zellen, x625;
- D, Fibronectin von MC3T3-CH₁-FBR-Zellen, x625.



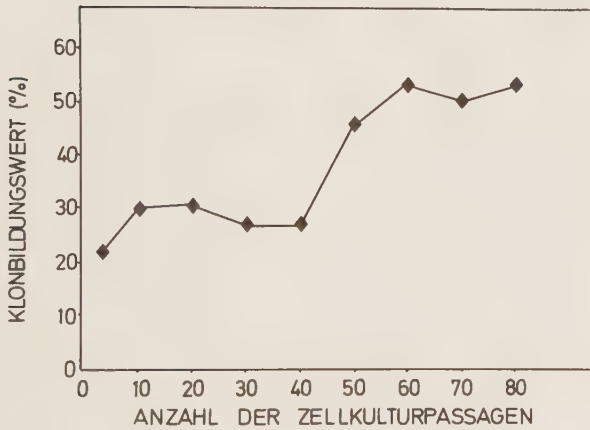


Abb. 5.

Absoluter Klonbildungswert einer OA MuLV-infizierten permanenten Osteoblastenzelllinie (MC3T3-CH₁-OA) im Verlauf zunehmender Zellkulturpassagen.

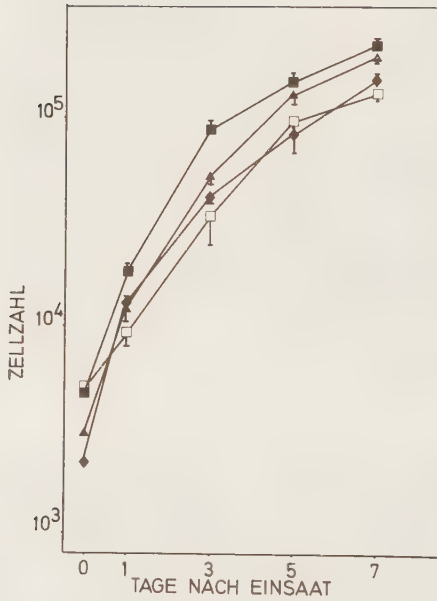


Abb. 6a.

Darstellung des Zellwachstums einer OA MuLV-infizierten permanenten Osteoblastenzelllinie (MC3T3-CH₁-OA) im Verlauf zunehmender Zellkulturpassagen.

Das Wachstum der Zellen wurde jeweils über einen Zeitraum von 7 Tagen gemessen.

Nicht infizierten Osteoblastenzellen (MC3T3-CH₁) dienen als Kontrolle.

- MC3T3-CH₁;
- ◆ MC3T3-CH₁-OA, 3. Passage;
- ▲ MC3T3-CH₁-OA, 22. Passage;
- MC3T3-CH₁-OA, 51. Passage.

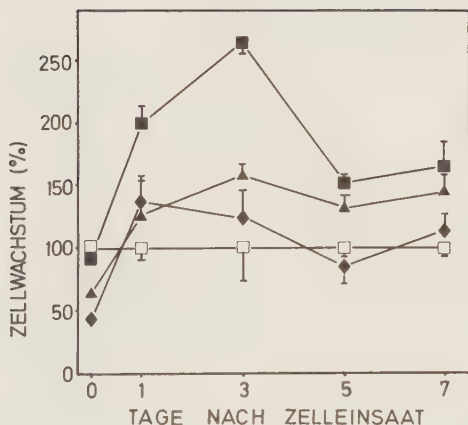


Abb. 6b.

Relatives Zellwachstum einer OA MuLV-infizierten permanenten Osteoblastenzelllinie (MC3T3-CH₁-OA) im Verlauf zunehmender Zellkulturpassagen. Das Wachstum der Zellen wurde jeweils über einen Zeitraum von 7 Tagen gemessen und mit dem von nicht infizierten Kontrollzellen (Wachstum von MC3T3-CH₁-Zellen = 100 %) verglichen.

- MC3T3-CH₁;
- ◆ MC3T3-CH₁-OA, 3. Passage;
- ▲ MC3T3-CH₁-OA, 22. Passage;
- MC3T3-CH₁-OA, 51. Passage.

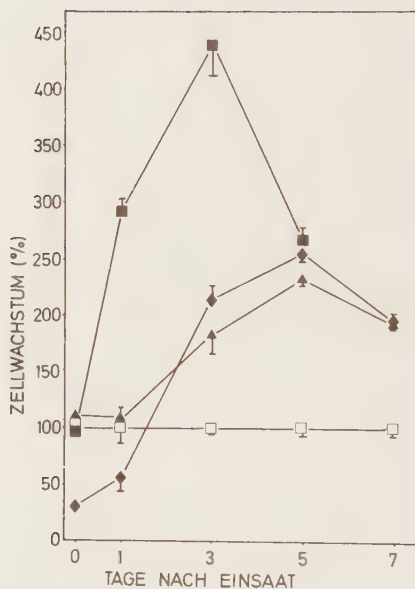


Abb. 7.

Relatives Zellwachstum von virusinfizierten permanenten Osteoblastenzellen im Vergleich zum Wachstum von nicht infizierten Kontrollzellen (Wachstum von MC3T3-CH₁-Zellen = 100 %).

- MC3T3-CH₁;
- ▲ MC3T3-CH₁-OA (mit dem murinen OA Leukämievirus infiziert), 81. Zellkulturpassage;
- MC3T3-CH₁-OA t. (OA MuLV-infiziert, tumorigen);
- ◆ MC3T3-CH₁-FBR (mit dem murinen Osteosarkomvirus FBR MSV transformiert).

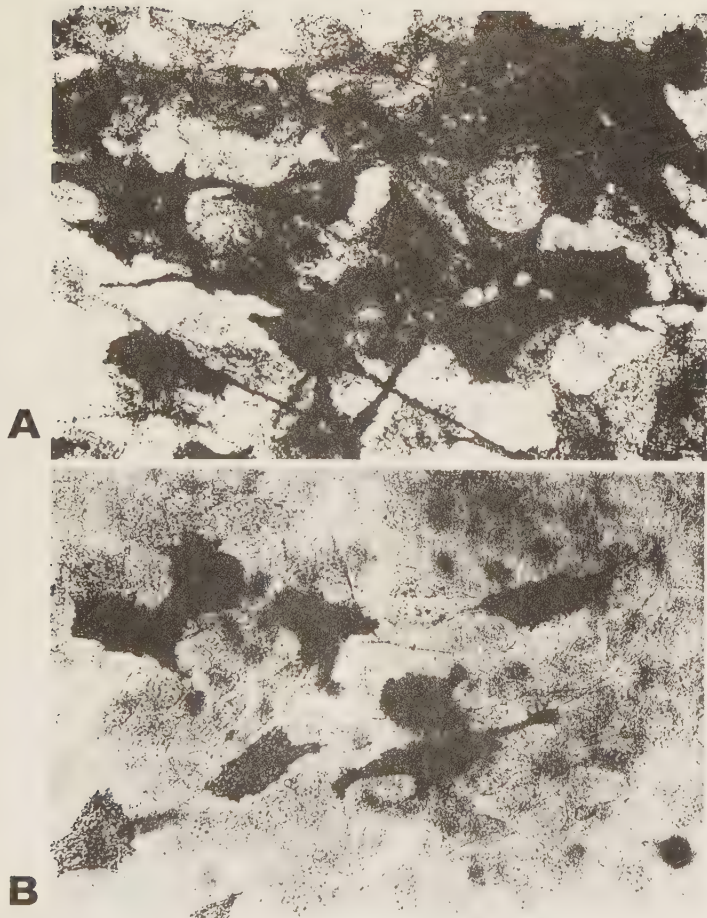
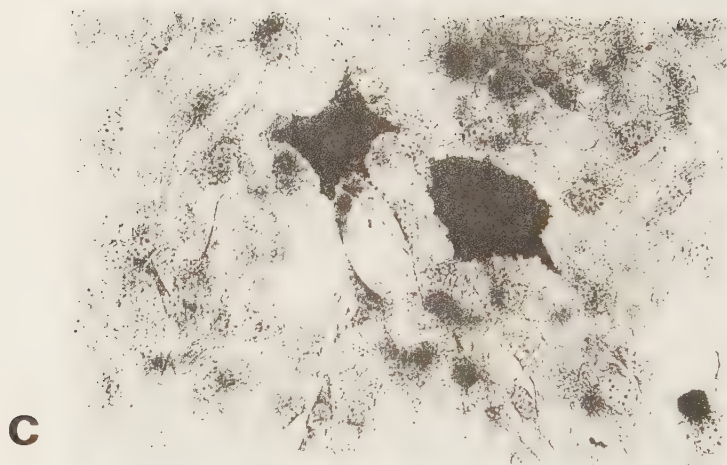


Abb. 8. (siehe auch Tabelle 1)
Histochemische Darstellung der alkalischen
Phosphatase (ALP) in Osteoblastenzellen (Beispiele).

- A, +++ (über 50 % ALP-positive Zellen):
z.B. MC3T3-CH₁-Kontrollzellen, 10 Tage
nach Einsaat;
- B, ++ (11 bis 50 % ALP-positive Zellen):
z.B. OA MuLV-infizierte MC3T3-CH₁-Zellen,
22. Zellkulturpassage, 10 Tage nach Einsaat;
- C, + (bis zu 10 % ALP-positive Zellen):
z.B. OA MuLV-infizierte MC3T3-CH₁-Zellen,
22. Zellkulturpassage, 5 Tage nach Einsaat;
- D, - (keine ALP-positiven Zellen):
z.B. OA MuLV-infizierte MC3T3-CH₁-Zellen,
59. Zellkulturpassage, 5 Tage nach Einsaat.



A

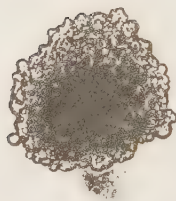
B

Abb. 9.

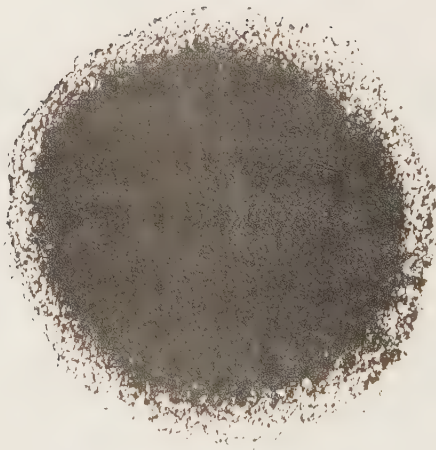
Wachstum von OA MuLV-infizierten Osteoblastenzellen, von tumorigenen OA MuLV-infizierten Osteoblastenzellen und von FBR MSV-transformierten Osteoblastenzellen im Weichagar-Medium.

- A, nicht infizierte MC3T3-CH₁-Kontrollzellen (2 Einzelzellen, siehe Pfeile), xl25;
- B, Weichagar-Medium Kolonie einer MC3T3-CH₁-OA-Zelle, 110. Zellkulturpassage, xl25;
- C, Weichagar-Medium Kolonie einer tumorigenen MC3T3-CH₁-OA-Zelle, xl25;
- D, Weichagar-Medium Kolonie einer MC3T3-CH₁-FBR-Zelle, xl25.

C



D



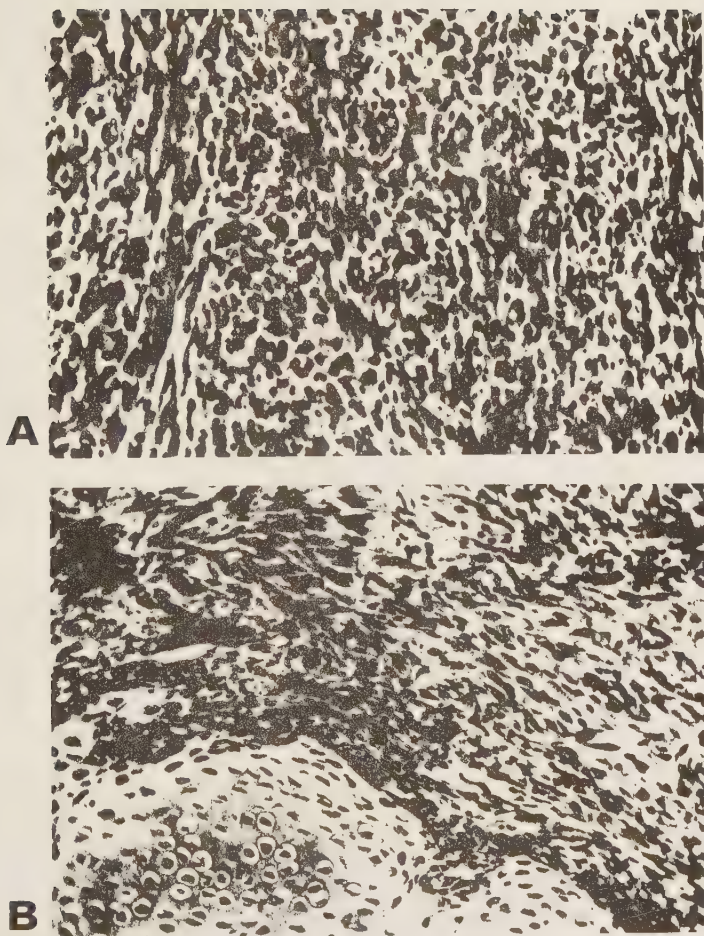


Abb. 10.

Histologische Darstellung von Tumoren, die nach subkutaner Injektion von tumorigenen OA MuLV-infizierten Osteoblastenzellen und von FBR MSV-transformierten Osteoblastenzellen induziert worden waren, HE-Färbung.

- A, MC3T3-CH₁-OA-induzierter Tumor.
Spindelzelliges, z.T. polymorphzelliges Sarkom mit vielen Mitosen, xl25.
- B, MC3T3-CH₁-FBR-induzierter Tumor.
Fibrosarkom mit Bereichen einer chondroiden Differenzierung, xl25.

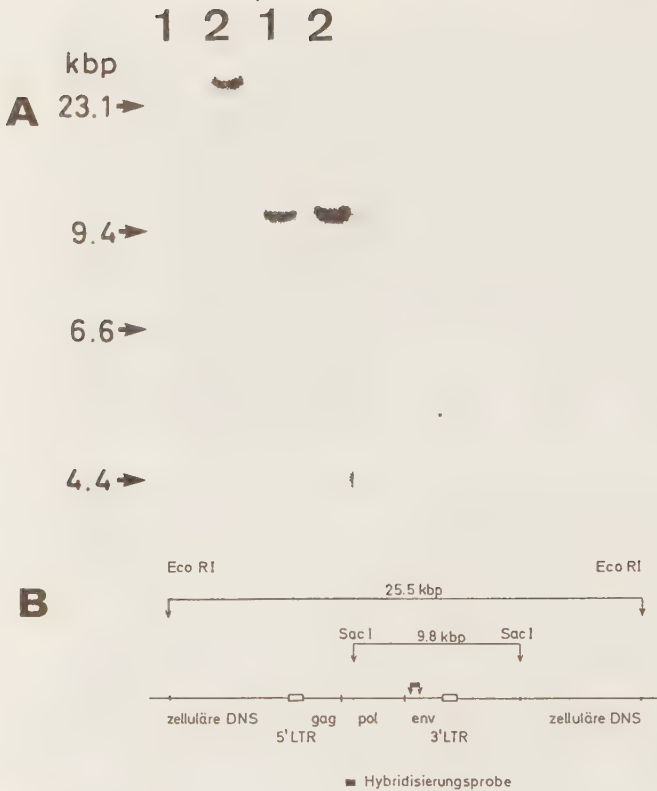


Abb. 11.

A, Molekularbiologische Analyse der DNS (Thymus) einer C57BL/6 Maus (Spur 1) und der DNS der permanenten MC3T3-CH₁-Osteoblastenzelllinie (Spur 2). Die Hybridisierung mit einer Probe für ecotrope murine Leukämieviren zeigt die jeweils einmal vorliegende Kopie des endogenen ecotropen Provirusgenom in Zellen der C57BL/6 Maus.

Spur 1 und 2, links: Eco RI-verdaute DNS;

Spur 1 und 2, rechts: Sac I-verdaute DNS.

B, Schematisch Darstellung der Genstruktur eines murinen ecotropen Leukämievirus. Die viralen Gene für die Strukturproteine (gag), die DNS-Polymerase (pol) und die Hüllproteine sind von repetitiven Sequenzen (LTRs) flankiert.

Die Probe für ecotrope Leukämieviren hybridisiert mit einem Teil des env-Genes.

Das Restriktionsenzym Eco RI schneidet nur in der benachbarten zellulären DNS; das Restriktionenzym Sac I hat eine zusätzliche Schnittstelle im pol-Gen.

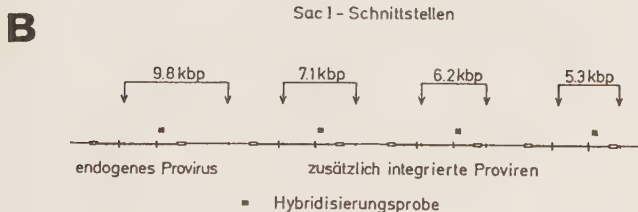
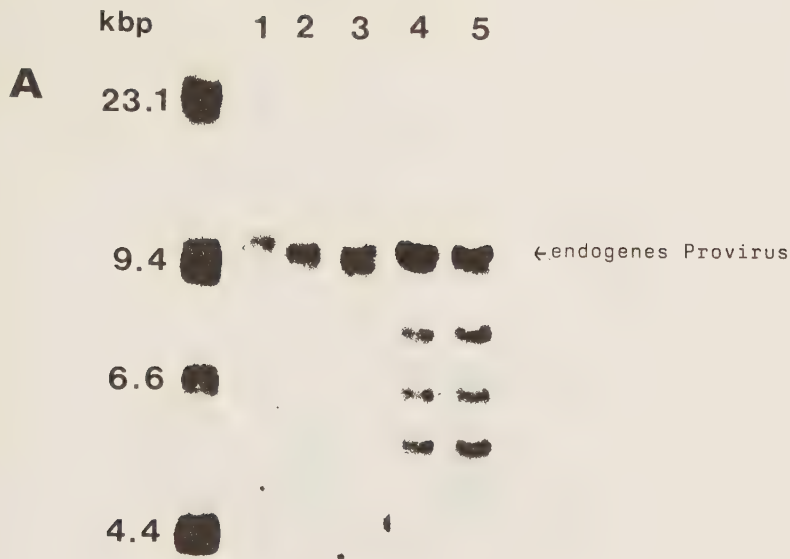


Abb. 12.

A, Molekularbiologische Analyse der DNS einer OA MuLV-infizierten Osteoblastenzelllinie in verschiedenen Zellkulturopassagen nach der Infektion. In der 41. und in der 52. Zellkulturopassage sind neben dem Signal für das endogene Provirus drei zusätzliche Virusintegrationsbanden in der zellulären DNS zu erkennen (Sac I-Restriktionsenzymverdau).

Spur 1: DNS der MC3T3-CH₁-Kontrollzellen;
 Spur 2: DNS der MC3T3-CH₁-OA-Zellen, 4. Passage nach der Infektion;
 Spur 3: wie Spur 2, 13. Passage nach der Infektion;
 Spur 4: wie Spur 2, 41. Passage nach der Infektion;
 Spur 5: wie Spur 2, 51. Passage nach der Infektion.

B, Schematisch Darstellung des endogenen Provirus der C57BL/6 Maus und zusätzlich integrierter OA MuLV-Genome, die ab der 41. Passage zu erkennen sind. Der Verdau mit dem Restriktionsenzym Sac I zeigt drei neu integrierte Proviren.



Abb. 13.

Molekularbiologische Analyse der DNS dreier Klone (Spur 1, 2 und 3) aus einer frisch mit OA MuLV-infizierten Osteoblastenzelllinie (5. Zellkulturpassage). Die drei untersuchten Sublinien zeigen ein jeweils unterschiedliches Virusintegrationsmuster.

Spur 1, 2, 3, links: Eco RI-verdaute DNS;
Spur 1, 2, 3, rechts: Sac I-verdaute DNS.



Abb. 14.

Molekularbiologische Analyse der DNS von 5 klonalen Sublinien (Spur 1,2,3,4 und 5) der mit OA MuLV infizierten tumorigenen Osteoblastenzelllinie. Die fünf untersuchten Klone zeigen ein identisches Virusintegrationsmuster.

Spur 1 - 5, links: Eco RI-Restriktionsenzymverdau der DNS;
Spur 1 - 5, rechts: Sac I-Restriktionsenzymverdau der DNS.

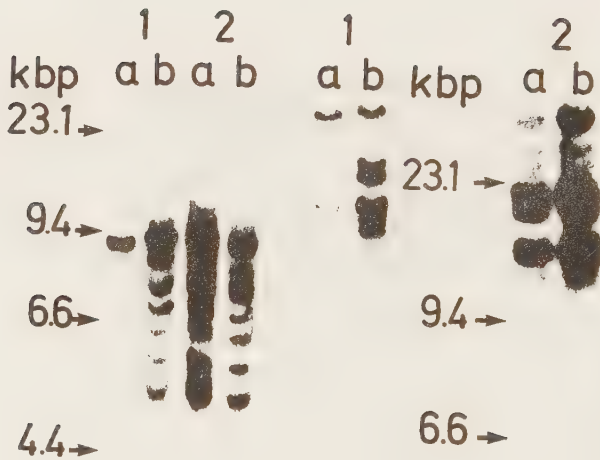


Abb. 15.

Molekularbiologische Analyse der DNS zweier Tumoren (86/257, 86/258), welche durch Injektion tumorigener OA MuLV-infizierter Osteoblastenzellen induziert worden waren und zweier aus diesen Tumoren etablierten Zelllinien (MC3T3-CH₁-OA t. TZ I und II).

Spur 1a und b: DNS aus Tumoren (86/257, 86/258);

Spur 2a und b: DNS von Zelllinien (TZ I, TZ II), welche aus diesen Tumoren etabliert worden waren.

Links: Sac I-Restriktionsenzymverdau der DNS;

Rechts: Eco RI-Restriktionsenzymverdau der DNS.

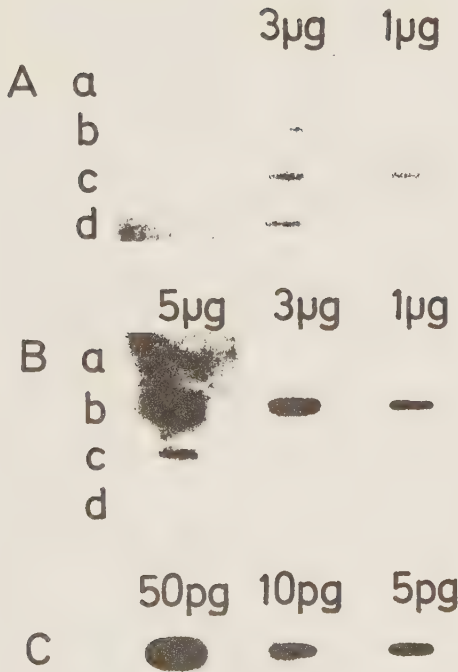


Abb. 16.

Molekularbiologische Analyse der DNS und RNS zweier OA MuLV-infizierter Osteoblastenzelllinien (MC3T3-CH₁-OA) und der tumorigenen OA MuLV-infizierten Osteoblastenzelllinie (MC3T3-CH₁-OA t.).

A, DNS-Analyse:

- a, MC3T3-CH₁-Kontrollzellen,
- b, MC3T3-CH₁-OA-Zellen, tumorigen,
- c, MC3T3-CH₁-OA-Zellen,
- d, MC3T3-CH₁-OA-Zellen, parallel kultiviert.

B, RNS-Analyse: a - d siehe A.

C, Hybridisierungskontrolle mit dem Plasmidinsert pSV-myc-1.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Aaronson, S.A., and W.P. Rowe, 1970: Non-producer clones of murine sarcoma virus transformed BALB/3T3 cells. *Virology* 42:9-19.

Aaronson, S.A., and J.R. Stephenson, 1979: Endogenous type C RNA viruses of mammalian cells. *Biochem. Biophys. Acta* 456:323-354.

Baltimore, D., 1970: RNA-dependant DNA-polymerase in virions of RNA tumor viruses. *Nature* 226:1209-1211.

Bassin, R.H., P.J. Simmons, F.C. Chesterman, and J.J. Harvey, 1968: Murine sarcoma virus (Harvey): characteristics of focus formation in mouse embryo cell cultures, and virus production by hamster tumor cells. *Int. J. Cancer* 3:265-271.

Bernhard, W., 1958: Electron microscopy of tumor cells and tumor viruses. A review. *Cancer Res.* 18:491-509.

Borek, C., 1979: Symposium on transformation in vitro. *Rad. Res.* 79:209-232.

Chattopadhyay, S.K., M.R. Lander, E. Rands, and D.R. Lowy, 1980: Structure of endogenous murine leukemia virus DNA in mouse genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77:5774-5778.

Chen, T.R., 1977: In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain. *Exp. Cell. Res.* 104:255-262.

Chirgwin, J.M., A.E. Przybyla, R.J. MacDonald, and W.J. Rutter, 1979: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18:5294-5299.

Clarkson, B., and R. Baserga, 1974: Control of proliferation in animal cells. Cold Spring Harbor Laboratory.

Corcoran, L.M., J.M. Adams, A.R. Dunn, and S. Cory, 1984: Murine T Lymphomas in which the cellular myc oncogene has been activated by retroviral insertion. *Cell* 37:113-122.

Depinho, R.A., K. Hatton, P. Ferrier, K. Zimmerman, E. Legouy, A. Tesfaye, R. Collum, G. Yancopoulos, P. Nilsen, and F. Alt, 1986: Myc family genes: A dispersed multi-gene family. *Annals of Clinical Research* 18: 284-289.

Duc-Nguyen, H., 1968: Enhancing effect of diethylaminoethyl-dextran on the focus forming titer of murine sarcoma virus. *J. Virol.* 2:643-644.

Eider, J.H., J.W. Gautsch, F.C. Jensen, R.A. Lerner, J.W. Hartley, and W.P. Rowe, 1977: Biochemical evidence that MCF murine leukemia viruses are envelope (env) gene recombinants. Proc. Natl. Acad. Sci. 74:4676-4680.

Erfle, V. and G. Neumann, 1980: Bacteriological examination of specified-pathogen-free animals: a procedure for small rodents. Laboratory Animals 14:123-126.

Erfle, V., S. Schulte-Overberg, K.-H. Marquard, I.-D. Adler, and A. Luz, 1979: Establishment and characterization of C-type RNA virus-producing cell lines from radiation-induced murine osteosarcomas. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 94:149-162.

Erfle, V., R. Hehlmann, H. Schetters, J. Schmidt, and A. Luz, 1981: Radiation-induced murine leukemias and endogenous retrovirus: time course of viral expression, p. 537-540. In: R. Neth, et al. (eds.), Haematology and Blood Transfusion, Vol. 26. Modern Trends in Human Leukemia. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.

Erfle, V., J. Schmidt, P.G. Strauß, R. Hehlmann, and A. Luz, 1986: Activation and biological properties of endogenous retroviruses in radiation osteosarcomagenesis. Leukemia Res. 10:905-913.

Finkel, M.P., C.A. Reilly jr., and B.O. Biskis, 1966: Virus induction of osteosarcoma in mice. Science 151:698-700.

Finkel, M.P., and C.A. Reilly jr., 1973: Observation suggesting the viral etiology of radiation-induced tumors, particularly osteogenic sarcomas, p. 278-288. In: C.L. Sanders, R.H. Busch, J.E. Ballou, and D.D. Malum, (eds.), Radionuclide Carcinogenesis. United States Atomic Energy Commission., Oak Ridge, Tenn., USA.

Finkel, M.P., C.A. Reilly jr., and B.O. Biskis, 1975: Viral etiology of bone cancer. Front Radiat. Ther. Oncol. 10:28-39.

Fredrickson, T.N., W.Y. Langdon, P.M. Hoffmann, J.W. Hartley, and H.C. Morse, 1984: Histologic and cell surface antigen studies of hematopoietic tumors induced by Cas-Br-M murine leukemia virus. J. Natl. Cancer Res. 72:447-452.

Friend, C., 1957: Cell-free transmission in adult Swiss mice of a disease having the character of leukemia. J. Exp. Med. 105:307-318.

Gardner, M.B., B.E. Henderson, J.D. Estes, R.W. Rongey, J. Casagrande, M. Pike, and R.J. Huebner, 1976: The epidemiology and virology of C-type virus-associated hematological cancers related diseases in wild mice. Cancer Res. 36:574-581.

- Gardner, M.B., V. Klement, and B.E. Henderson, 1978: Lymphoma, paralysis, and oncornaviruses of wild mice. In: Severi L., ed. Tumors of early life in man and animals. Perugia quadrennial international conferences on cancer. Perugia, Italy: Monteluca 343-356.
- Gendelman, H.E., W. Phelps, L. Feigenbaum, J.M. Ostrove, A. Adachi, P.M. Howley, G. Khoury, H.S. Ginsberg, and M.A. Martin, 1986: Trans-activation of the human immunodeficiency virus long terminal repeat sequence by DNA viruses. Proc. Natl. Acad. Sci. 83:9759-9763.
- Goodwin, R.G., F.M. Rottman, T. Callaghan, H.-J. Kung, P.A. Maroney, and T.W. Nilsen, 1986: c-erbB activation in avian virus-induced erythroblastosis: multiple epidermal growth factor receptor mRNA are generated by alternative RNA Processing. Mol. Cell. Biol. 6:3123-3133.
- Greenberger, J.S., J.R. Stephenson, W.C. Moloney, and S.A. Aaronson, 1975: Different hematological diseases induced by type C viruses chemically activated from embryo cells of different mouse strains. Cancer Res. 35:245-252.
- Gross, L., 1951: Spontaneous leukemia developing in C3H mice following inoculation in infancy, with AK-leukemia extract, or AK-embryos. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 76:27-32.
- Hartley, J.W., and W.P. Rowe, 1966: Production of altered cell foci in tissue culture by defective moloney sarcoma virus particles. Proc. Natl. Acad. 55:780-786.
- Hartley, J.W., N.K. Wolford, L.J. Old, and W.P. Rowe, 1977: A new class of murine leukemia virus associated with development of spontaneous lymphomas. Proc. Natl. Acad. Sci. 74:789-792.
- Hayward, W.S., B.G. Neel, and S.M. Astin, 1981: Activation of a cellular onc gene by promotor insertion in ALV-induced lymphoid leukosis. Nature (London) 290:475-480.
- Hedberg, K.K., and L.B. Chen, 1986: Absence of intermediate filaments in a human adrenal cortex carcinoma-derived cell line. Exp. Cell Res. 163:509-517.
- Ikeda, K., T. Matsumoto, K. Morita, K. Kurokawa, and E. Ogata, 1986: Inhibition of in vitro mineralization by aluminium in a clonal osteoblastlike cell line MC3T3-E1. Calcif. Tiss. Int. 39:319-323.
- Kakunaga, T., 1978: Neoplastic transformation of human diploid fibroblast cells by chemical carcinogens. Proc. Natl. Acad. Sci. 75:1334-1338.
- King W., M.D. Patel, L.I. Lobel, S.P. Goff, and M.C. Nguyen-Huu, 1985: Insertion mutagenesis of embryonal carcinoma cells by retroviruses. Science 228:554-558.

Knippers, R., K.P. Schäfer und E. Fanning, 1985:
Molekulare Genetik (Lehrbuch). Georg Thieme Verlag
Stuttgart, New York.

Kodama, H., Y. Amagai, H. Sudo, S. Kasai, and S. Yamamoto,
1981: Establishment of clonal osteogenic cell line from
newborn mouse calvaria. Jap. J. Oral Biol. 23:899-901.

Lachman H.M., K.S. Hatton, A.I. Skoultchi, and C.L.
Schildkraut, 1985: c-myc mRNA levels in the cell cycle
change in mouse erythroleukemia cells following inducer
treatment. Proc. Natl. Acad. Sci. 82:5323-5327.

Land, H., L.F. Parada, and R.A. Weinberg, 1983:
Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts
requires at least two cooperating oncogenes. Nature
304:596-602.

Leib-Mösch, C., J. Schmidt, M. Etzerodt, F.S. Pedersen, R.
Hehlmann, and V. Erfle, 1986: Oncogenic retrovirus from
spontaneous murine osteomas. Virology 150:96-105.

Lenz, J., R. Crowther, A. Straceski, and W. Haseltine,
1982: Nucleotide sequence of the AKV env gene. J. Virol.
42:519-529.

Levy, J.A., 1978: Xenotropic type-C viruses. Current
tropics in Microbiology and Immunology. Springer-Verlag,
Berlin 111-213.

Lloyd E.L., M.A. Gemmell, C.B. Henning, D.S. Gemmell, and
B.J. Zabransky, 1979: Transformation of mammalian cells by
alpha particles. Int. J. Radiat. Biol. 36:467-478.

MacPherson. I., and L. Montagnier, 1964: Agar suspension
culture for the selective assay of cells transformed by
polyoma virus. Virology 23:291-294.

McMaster, G.K. and G.G. Carmichael, 1977: Analysis of
single and double-stranded nucleic acids on polyacrilamide
and agarose gels by using glyoxal and acridine orange.
Proc. Natl. Acad. Sci. 74:4835-4838.

Maniatis, T., E.F. Fritsch, J. Sambrook, 1982: Molecular
cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor
Laboratory, New York.

Mössner, E., M. Boll, and G. Pfeleiderer, 1980:
Purification of human and bovine alkaline phosphatases by
affinity chromatographie. Physiol. Chem. 361:543-549.

Moloney, J.B., 1960: Biological studies on a lymphoid
leukemia virus extracted from sarcoma S 37. 1. Origin and
introductory investigations. J. Natl. Cancer Inst.
24:933-951.

Nexo, B.A., 1977: A plaque assay for murine leukemia virus using enzyme coupled antibodies. *Virology* 77:849-852.

Nowinski, R.C., and E.F. Hayes, 1978: Oncogenicity of AKR endogenous leukemia viruses. *J. Virol.* 27:13-18.

Osaki, Y., M. Tsunoi, Y. Hakeda, K. Kurisu, and M. Kumegawa, 1984: Immunocytochemical study of collagen in epidermal growth factor (EGF)-treated osteoblastic cells. *J. Histochem. Cytochem.* 32:1231-1233.

Pacifici, M., D. Boettiger, K. Roby, and H. Holtzer, 1977: Transformation of chondroblasts by Rous sarcoma virus and synthesis of the sulfated proteoglycan matrix. *Cell* 11:891-899.

Piechaczyk, M., J.-M. Blanchard, and P. Jeanteur, 1987: C-myc gene regulation still holds its secret. *TIG* 3:47-51.

Pollack, R., M. Osborn, and K. Weber, 1975: Patterns of organization of actin and myosin in normal and transformed cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72:994-998.

Price C.H.G., M. Moore, and D.B. Jones, 1972: FBJ virus-induced tumors in mice. A histopathological study of FBJ virus tumors and their relevance to murine and human osteosarcoma arising in bone. *Br. J. Cancer* 26:15-27.

Rauscher, R.J., 1962: A virus-induced disease of mice characterized by erythrocytopoiesis and lymphoid leukemia. *J. Natl. Cancer Inst.* 29:515.

Redinbaugh, M.G., and R.B. Turley, 1986: Adaptation of the bicinchoninic acid protein assay for use with microtiter plates and sucrose gradient fractions. *Anal. Biochem.* 153: 267-271.

Rigby, P.W.J., M.A. Dieckmann, C. Rhodes, and P.J. Berg, 1977: Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113:237-251.

Risser, R., J.M. Horowitz, and J. McCubrey, 1983: Endogenous mouse leukemia viruses. *Ann. Rev. Genet.* 17:85-121.

Rosen, C.A., J.G. Sodroski, R. Kettman, and W.A. Haseltine, 1986: Activation of enhancer sequences in type II human T-cell leukemia virus and bovine leukemia virus long terminal repeats by virus-associated trans-acting regulatory factors. *J. Virol.* 57:738-744.

Rowe, W.P., M.W. Cloyd, and J.W. Hartley, 1979: Status of the association of mink cell focus forming viruses with leukemogenesis. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 44:1265-1268.

Schmidt, J., V. Erfle, F.S. Pedersen, H. Rohmer, H. Schetters, K.-H. Marquart, and A. Luz, 1984: Oncogenic retrovirus from spontaneous osteomas. I. Isolation and biological characterization. J. gen. Virol. 65:2237-2248.

Schmidt, J., V. Erfle, and W.A. Müller, 1985: Activation of endogenous C-type retroviral genomes by internal alpha-irradiation of mice with $^{224}\text{Radium}$. Radiat. Environ. Biophys. 24:17-25.

Schmidt, J., E. Livne, V. Erfle, W. Gössner and M. Silbermann, 1986: Morphology and in vivo growth characteristics of an atypical murine proliferative osseous lesion induced in vitro. Cancer Research 46:3090-3098.

Schmidt, J., M. Casser-Bette, G.A. Rodan, C. Baumgartner-Decker, and V. Erfle, 1987: Bone tumor-inducing retroviruses and osteoblastic cells in vitro: target cell specificity and effects of viral infection, p. 73-91. In: S. Hurwitz and J. Sela (eds.), Recent Advances in Skeletogenesis. Pergamon Press.

Schmidt, J., A. Luz, and V. Erfle: Endogenous C-type retroviruses: Frequency of radiation-activation and novel pathogenic effects of viral isolates. Manuscript submitted.

Shen-Ong, G.L.C., H.C. Morse III, M. Potte, and J.F. Mushinski, 1986: Two modes of c-myc aktivation in virus-induced mouse myeloid tumors. Mol. Cell. Biol. 6:380-392.

Sleigh, M.J., 1985: Virus expression as a probe of regulatory events in early mouse embryogenesis. TIG Jan. 1985:17-22.

Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goetze, B.J. Olson, and D.C. Klenk, 1985: Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 150:76-85.

Sodroski, J.G., C.A. Rosen, and W.A. Haseltine, 1984: Trans-acting transcriptional activation of the long terminal repeat of human T-lymphotropic viruses in infected cells. Science 225:381-385.

Sorrentino, V., V. Drozdoff, L. Zeitz, and E. Fleissner, 1987: Increased radiation-induced transformation in C3H/10T1/2 cells after transfer of an exogenous c-myc gene. Proc. Natl. Acad. Sci. 84:4131-4134.

Southern, E.M., 1975: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98:503-517.

Sparks, R.L., E.I. Seibel-Ross, M.L. Wier, and R.E. Scott, 1986: Differentiation, dedifferentiation, and transdifferentiation of BALB/c 3T3 mesenchymal stem cells: potential significance in metaplasia and neoplasia. *Cancer Res.* 46:5312-5319.

Sudo, H., H.-A. Kodama, Y. Amagai, S. Yamamoto, and S. Kasai, 1983: In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J. Cell Biol.* 96:191-198.

Tamkun, J.W., D.W. DeSimone, D. Fonda, R.S. Patel, C. Buck, A.F. Horwitz, and R.O. Hynes, 1986: Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell* 46:271-282.

Tennant, R.W., J.A. Otten, F.E. Myer, and R.J. Rascati, 1982: Induction of retrovirus gen expression in mouse cells by some chemical mutagens. *Cancer Res.* 42:3050-3055.

Todaro, G.J., and H. Green, 1963: Quantitive studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established line, *J. Cell Biol.* 17:299-313.

Ulrich, K., and B.A. Nexø, 1985: Spontaneous expression of C-type virus in DBA/2 mice is associated with an increased rate of mortality, independent of neoplastic disease. *J. Virol.* 53:273-278.

Vaheri, A., M. Kurkinen, V.-P. Letho, E. Linder, and R. Timpl, 1978: Codistribution of pericellular matrix proteins in cultured fibroblasts and loss in transformation: fibronectin and procollagen. *Cell Biol.* 75:4944-4948.

Van Beveren, C., S. Enami, T. Curran, and I.M. Verma, 1984: FBR murine osteosarcoma virus. II. Nucleotide sequence of the provirus reveals that the genome contains sequences acquired from two cellular genes. *Virology* 135:229-243.

Verma, I.M., 1986: Proto-oncogene fos: a multifaceted gene. *TIG* April 1986:93-96.

Wlodarski, K., M. Kobus, M. Luczak, and J. Dolowy, 1981: Virally induced periosteal osteogenesis in mice. *Calcif. Tiss. Int.* 33:135-142.

Yamada K.M., K. Olden, and J. Pastan, 1978a: Transformation-sensitive cell surface protein: isolation, characterization, and role in cellular morphology and adhesion, p. 256-277. In: A. Vaheri, E. Ruoslahti, and D.F. Moser (eds.), *Fibroblast surface protein*. New York Acad. Sci., New York.

Yamada, K.M., and K. Olden, 1978b: Fibronectins - adhesive glycoproteins of cell surface and blood. Nature 275:179-184

Yoshimura, M., S.A. Jimenez, and A. Kaji, 1981: Effects of viral transformation on synthesis and secretion of collagen and fibronectin-like molecules by embryonic chick chondrocytes in culture. J. Biol. Chem. 256:9111-9117.

Zijlstra, M., and C.J. Melief, 1986: Virology, genetics and immunology of murine lymphomagenesis. Biochem. Biophys. Acta 865:197-321.

Anhang

1. PBS (Phosphate buffered saline):

41 g NaCl
2 g KCl
8,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
1,5 g KH_2PO_4
ad 5 l Aqua bidest.

2. Trypsinlösung:

0,5 g Trypsin
0,2 g EDTA
ad 1 l PBS

3. McIlvaine Puffer:

332 ml Zitronensäure (0,1 M)
668 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (35,6 g/l)
1000 ml

4. Substratlösung für die indirekte Immunperoxidase Färbung (nach Nexø, 1977)

-20 mg 3-Amino-9-Äthylcarbazol (Fa. Sigma) in 5 ml
N,N-Dimethylformamid (DMFA, Fa. Merck) auflösen,
-Zugabe von 95 ml einer 50 mM Azetatpufferlösung, pH 5,0,
-Filtration durch einen Papierfilter,
-Zugabe von 50 µl 30 %igem H_2O_2 .

5. Substratlösung für alkalische Phosphatase

-25 mg Naphtol AS-MX Phosphat (Fa. Sigma) in 2,5 ml
N,N-Dimethylformamid auflösen,
-Zugabe von 250 ml einer 0,1 M Tris-HCl-Lösung, pH 8,3,
-Zugabe von 250 mg Fast Blue BB Salz (Fa. Serva).

6. Reagenzien A und B für Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA)

A.

8 55 g Na_2CO_3
2,0 g NaOH
0,8 g Na_2 -Tartrat
4,75 g NaHCO_3
5,0 g BCA- Na_2
ad 0,5 l Aqua dest.
mit NaOH auf pH 11,25 eingestellt

B.

2 g CuSO_4
ad 50 ml Aqua dest.

7. Autoklavierte Vorratslösungen für den Softagaransatz:

- a) Agaroselösung: 1,25 g Agarose (Fa. Sigma, Typ III) auf 100 ml Aqua dest.,
- b) Dehydrierte Tryptosephosphatboullion: 2,95 g Tryptosephosphat (Difco-Bacto) auf 100 ml Aqua dest.,
- c) Dextranlösung: 50 mg DEAE-Dextran (Duc-Nguyen, 1968) auf 100 ml PBS.

8. Halbfeste Agarunterlage:

-10 ml FKS + 10 ml Tryptosephosphatboullion (b) + 40 ml D'MEM auf 44°C erwärmt ergab Lösung d),
-40 ml Agaroselösung (a) + 0,4 ml Dextranlösung (c) auf 44°C erwärmt und zur Lösung d) gegeben ergab das Softagar-Medium (SAM),
- 7 ml SAM je Petrischale einfüllen und ca. 1 Stunde abkühlen lassen.

9. Homogenisierungslösung:

1 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,5
2 ml 5 M NaCl
2 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0
1 ml 10 %iges SDS (Natrium-Dodecyl-Sulfat)
1 ml Proteinase K (10 mg/ml)
ad 100 ml Aqua dest.

10. Reaktionspuffer

1,5 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,5
0,9 ml 1 M MgCl₂
0,067 ml Mercaptoäthanol (Fa. Serva, reinst)
30,0 mg bovines Serumalbumin
3,0 ml 5 M NaCl, nur bei Y-100
ad 30,0 ml Aqua dest.
Puffer bei Anwendung 1 : 5 verdünnen.

11. TGA-Puffer (10-fach konzentriert)

242,25 g Tris-HCl
136,1 g Natriumazetat
37,2 g EDTA
ad 5 l Aqua dest.
mit Eisessig auf pH 8,1 eingestellt

12. Glyoxilierungsmischung

52 µl DEPC-behandeltes dest. Wasser
4 µl 0,5 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0
44 µl 30 %iges Glyoxal (deionisiert, Fa. Merck Nr. 820610)
100 µl Dimethylsulfoxid (DMSO)
200 µl

13. Vorhybridisierungslösung

10,0 ml Formamid (Fa. Merck)
5,0 ml 20x SSC
1,0 ml 100x Denhardt's Lösung (20 g Ficoll, 20 g
Polyvinylpyrrolidone, 20 g BSA auf 1000 ml H₂O)
1,0 ml 1 M Natriumphosphatpuffer, pH 6,5
1,0 ml denaturierte Lachs-DNS in TE (5 g/ml)
2,0 ml 10 %ige Glyzinlösung
20,0 ml

14. Hybridisierungslösung

5,0 ml Formamid
2,5 ml 20x SSC
0,5 ml 100x Denhardt's Lösung
0,2 ml 1 M Natriumphosphatpuffer
0,1 ml denaturierte Lachs-DNS in TE
1,0 ml 25 %iges Dextransulfat (Fa. Sigma)
0,7 ml Aqua bidest.
10,0 ml

DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. Dr. h.c.mult. Anton Mayr möchte ich herzlich für die Überlassung des Themas und für seine aufgeschlossene Haltung danken.

Herrn PD Dr. Dr. habil. Volker Erfle, Herrn Dr. Jörg Schmidt, Herrn Dr. Günter Strauß und Herrn PD Dr. Dr. habil. Arne Luz danke ich hiermit für die immer freundlich gewährte Hilfe und die zahlreichen, wertvollen Anregungen bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Darüberhinaus möchte ich allen danken, die mir bei der Durchführung der Versuche mit Rat und Tat zur Seite standen, insbesondere Frau Christine Baumgartner-Decker und Herrn Frank Heinemann für die jederzeit gewährte hilfreiche Beratung in technischen Fragen, sowie allen Mitarbeitern der Abteilung für Molekulare Zellpathologie und des Institutes für Pathologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung.

Die histologischen Arbeiten, sowie die pathologischen Untersuchungen wurden im Institut für Pathologie, unter Leitung von Herrn Dr. A. Luz durchgeführt.

Die Fotoarbeiten wurden im Labor von Herrn Goddeng durchgeführt.

Allen möchte ich ein herzliches Dankeschön sagen.

Nicht zuletzt gilt mein innigster Dank meinem Mann für seine Geduld und sein Verständnis beim Erstellen dieser Arbeit.

LEBENS LAUF

Ingrid Renner-Müller, geb. Renner

Geburtstag,

Geburtsort:

17. 12. 1959 in München

Eltern:

Volkmar Renner, Diplomingenieur
Annemarie Renner, geb. Boos

Familienstand:

seit 25. 8. 1987 verheiratet

Schulbildung:

1966 - 1970

Grundschule an der
Feldmochinger Str., München
Städtisches Adolf-Weber-
Gymnasium, München

1970 - 1979

27. 6. 1979

Abitur

4. 9. 1979 -

15. 9. 1980

Walner Schulen (Staatlich
anerkannte private Lehranstalt
für techn. Assistenten in der
Medizin), München

Studium:

WS 1980/81 - WS 1985/86

Studium der Veterinärmedizin,
Universität München

30. 1. 1986

Staatsexamen

5. 3. 1986

Approbation als Tierärztin

17. 2. 1986

Beginn der Arbeiten zu der
vorliegenden Dissertation

ab 1. 8. 1986

Tätigkeit als wissenschaftliche
Hilfskraft in der Abteilung für
Molekulare Zellpathologie der
Gesellschaft für Strahlen- und
Umweltforschung, München

